

Aus der Milchabteilung (vormals Leiter: ORVR Dr. G. Kielwein)
des Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamtes Aulendorf
Vorstand: Ob. Reg. Vet. Direktor Prof. Dr. K. Dedié

Aus der Abteilung Hygiene der Milch, Fische und Eier
am Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus Liebig-Universität Gießen
Vorsteher: Prof. Dr. G. Kielwein

Untersuchungen über das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden in Milchviehställen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Diethmar Albrecht
Tierarzt aus Aulendorf

Gießen 1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Milchabteilung (vormals Leiter: ORVR Dr. G. Kielwein)
des Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamtes Aulendorf
Vorstand: Ob. Reg. Vet. Direktor Prof. Dr. K. Dedié

Aus der Abteilung Hygiene der Milch, Fische und Eier
am Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus Liebig-Universität Gießen
Vorsteher: Prof. Dr. G. Kielwein

Untersuchungen über das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden in Milchviehställen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Diethmar Albrecht
Tierarzt aus Aulendorf

Gießen 1971

Dekan:

Prof. Dr. G. Lämmler

Berichterstatter:

Prof. Dr. G. Kielwein

Tag der mündlichen Prüfung:

9. Dezember 1971



MEINEN LIEBEN ELTERN

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	<u>Seite</u>
1.0 <u>Einleitung</u>	1
2.0 <u>Literaturübersicht</u>	3
2.1 Die Differenzierung und Charakterisierung von Pseudomonaden	3
2.11 Definition des Genus Pseudomonas	3
2.12 <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	6
2.13 <u>Pseudomonas fluorescens</u>	7
2.14 <u>Pseudomonas myxogenes</u>	9
2.15 <u>Pseudomonas putida</u>	9
2.16 <u>Pseudomonas taetrolens</u>	11
2.17 <u>Pseudomonas fragi</u>	12
2.18 Weitere in Milch nachgewiesene Pseudomonaden	13
2.2 Die Differenzierung und Charakterisierung von Aeromonaden	14
2.3 Die Anzüchtung von Pseudomonaden und Aeromonaden	16
2.4 Das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden	17
2.5 Die Kontamination von Rohmilch mit Pseudo- monaden und Aeromonaden	19
2.51 Das Vorkommen von Pseudomonaden in Rohmilch	19
2.52 Das Vorkommen von Aeromonaden in Rohmilch	21
2.6 Der Keimgehalt der Stalluft	21
2.61 Verfahren zur Ermittlung der Luftkeime	22
2.62 Die Luftkeimuntersuchung beeinflussende Faktoren	23

	<u>Seite</u>
3.0 <u>Eigene Untersuchungen</u>	24
3.1 <u>Material und Methoden</u>	24
3.11 <u>Material</u>	24
3.111 Herkunft der untersuchten Proben	24
3.112 Nährböden und Reagenzien	25
3.12 <u>Methoden</u>	27
3.121 Vorversuche	27
3.122 Die Probenahme	27
3.123 Bakteriologische Untersuchungsmethoden	28
3.124 Methodik der Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung der Kulturen	30
3.2 <u>Ergebnisse</u>	35
3.21 Vorversuche	35
3.211 Der Zusatz von Mycostatica zum Glutaminat- Stärke- Phenolrot-Agar (GSP)	35
3.212 Die Beeinflussung der Anzüchtungsergebnisse auf GSP-Platten durch die Expositionsdauer beim Sedimentationsverfahren	35
3.213 Besprechung der Ergebnisse der Vorversuche	35
3.3 <u>Hauptversuch</u>	36
3.31 Nachweis von Pseudomonaden und Aeromonaden	36
3.32 Identifizierung und Differenzierung der isolierten Kulturen	40
3.321 Die Identifizierung nach dem Vermögen zur Glukosespaltung und mittels der Cytochrom- oxydase-Reaktion	40
3.322 Die Differenzierung der Genera Pseudomonas und Aeromonas	41

	<u>Seite</u>
3.33	Das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden im Milchviehstall 42
3.331	Das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden auf Stallwänden 42
3.332	Das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden in Tränkebecken 42
3.333	Das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden in Futtertrögen 45
3.334	Das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden in Futtergängen 45
3.335	Das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden auf der Euteroberfläche 49
3.336	Das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden auf Liegeplätzen von Rindern 49
3.337	Das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden im Rinderkot 51
3.338	Das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden in Luft-Sedimentationsproben aus Milchviehställen und zugehörigen Milchkammern 51
3.34	Erhebungen über die Beziehung zwischen der "Sauberkeit" in den Milchviehställen und den Ergebnissen der bakteriologischen Untersu- chungen der Stallluft und der Stallwände 54
3.4	<u>Besprechung der Ergebnisse</u> 56
4.0	<u>Zusammenfassung</u> 64
5.0	<u>Literaturverzeichnis</u> 65

Einleitung

Die Keimflora der Milch entstammt dem Euter, der Euteroberfläche, der unmittelbaren Umgebung der Milchkuh, der Stallluft und den mit Milch in Berührung kommenden Gerätschaften. Im Zeitalter des Handmelkens wurde diese Flora von grampositiven, milchsäurebildenden Bakterien (Streptokokken, Laktobazillen) beherrscht. Nach Einführung des mechanischen Milchentzugs wurde eine Verschiebung der Rohmilchflora in Richtung gramnegative Schmutzbakterien beobachtet. Bei zunehmendem Einsatz der Tiefkühlung der Milch nahm der Anteil der Pseudomonaden und Aeromonaden an der gramnegativen Flora der Milch zu, wie von KIELWEIN³² dargestellt werden konnte.

Die milchhygienische Bedeutung der Pseudomonaden und Aeromonaden ist darin begründet, daß diese Bakterien vorwiegend psychrotroph sind und daß sie Kasein und Milchfett zu spalten vermögen (KIELWEIN³²).

Die Pseudomonaden und Aeromonaden der Milch entstammen nach den Untersuchungen von KIELWEIN^{28, 30, 32} und BEYTHIEN⁵ den Melkgeräten und anderen mit Milch in Berührung kommenden milchwirtschaftlichen Gerätschaften. Als primäre Kontaminationsquelle dieser Gerätschaften ist das Brauchwasser anzusehen (KIELWEIN³², BEYTHIEN⁵).

Da der Milchviehstall in der Regel auch die Gewinnstätte der Milch ist, sind Kenntnisse über das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden im Stallmilieu von entscheidender milchhygienischer Bedeutung. Die bisher hierzu vorliegenden Literaturangaben (CASELITZ⁷, RINGEN u. BRAKE⁵⁴) beziehen sich nur auf das Vorkommen von Ps. aeruginosa und berücksichtigen die übrigen milchhygienisch bedeutungsvollen Pseudomonaden und Aeromonaden nicht.

Durch meine Untersuchungen sollte geklärt werden, in welchem Umfang Pseudomonaden und Aeromonaden im Milchviehstall vorkommen, welche Arten hier anzutreffen sind und welche milchhygienischen Folgerungen aus dem Nachweis von Pseudomonaden und Aeromonaden im Milchviehstall zu ziehen sind.

2.0 Literaturübersicht

2.1 Die Differenzierung und Charakterisierung
von Pseudomonaden

2.11 Definition des Genus Pseudomonas

Nach HAYNES und BURKHOLDER (Bergey's Manual⁴) gelten für die Gattung Pseudomonas folgende Charakteristika:

"Pseudomonaden sind entweder monotrich oder lophotrich begeißelt, oder sie sind unbewegliche, gramnegative Bakterien. Sie bilden häufig ein diffusibles, fluoreszierendes Pigment von grüner, blauer, violetter, lila, rosagelber oder anderer Farbe. Die meisten Arten oxydieren Glukose zu 2-Ketoglukonsäure oder zu Intermediärprodukten. Laktose wird im allgemeinen nicht oxydiert. Nitrat wird häufig zu Nitrit, Ammoniak oder Stickstoff reduziert. Einige Arten spalten Fett und/oder Kohlenhydrate. Die Trennungslinie zwischen den geraden Pseudomonasstäbchen und den gebogenen Vibrionen ist nicht scharf. Gelegentlich können gebogene Stäbchen bei einzelnen Spezies auftreten. Die Trennung ist durch Anwendung von Antibiotika und Vibriostatika möglich..."

Bei LYSENKO⁴⁵, BEER³ und STANIER u. Mitarbeiter⁶⁴ finden sich weitere Definitionen des Genus Pseudomonas. Diese Autoren stellen vor allem die oxydative Glukosespaltung heraus.

Aufgrund der Ergebnisse der Charakterisierung von 272 milchhygienisch bedeutungsvollen Pseudomonadenkulturen und von 23 Referenzkulturen des Genus Pseudomonas sowie bei Berücksichtigung der Angaben in der Literatur stellt KIELWEIN³² folgende Definition des Genus Pseudomonas auf:

"Pseudomonaden sind gram-negative, in der Regel bewegliche Stäbchen, die polar begeißelt sind. Die Cytochromoxydasereaktion ist meist positiv. Aerobes Wachstum im HUGH-LEIFSON-Medium, Glukose und/oder Propanol werden oxydativ unter Säurebildung gespalten. Aus Aethanol, Glycerin und Xylose wird von der Mehrzahl der Arten oxydativ Säure gebildet. Dulcitol und Inulin werden nicht gespalten.

Na-Oxalat wird nicht und Na-Ascorbat in der Regel nicht als einzige Kohlenstoffquelle ausgewertet. Ammonium-Citrat, Natrium-Succinat und Natrium-Laktat werden von den meisten Arten als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle ausgewertet, während L(+)Cystin und L(-)Methionin in der Regel nicht verwertet werden.

Glutaminsäure kann als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle ausgewertet werden. Diese Fähigkeit fehlt Ps. boreopolis und Ps. maltophilia. KNO_3 wird zu NH_3 abgebaut. Die meisten Stämme sind gegen 100 IE Penicillin je ml Nährmedium resistent."

Zur Abgrenzung des Genus Pseudomonas von anderen Genera eignen sich die Prüfung auf oxydative Kohlenhydratspaltung im Medium nach HUGH und LEIFSON²⁴ und die Oxydase- bzw. Cytochromoxydasereaktion (KIELWEIN³², WAGNER⁷⁰).

Der Glukoseabbau durch Pseudomonaden erfolgt nicht nach dem EMBDEN-MEYERHOF-Schema, sondern die Glukose wird zur 2-Ketoglukonsäure oxydiert (Gunsalus, zit. bei KIELWEIN³²). Da der oxydative Glukoseabbau der Pseudomonaden nur unter aeroben Verhältnissen ablaufen kann, erfolgt im Medium nach HUGH-LEIFSON nur an der Oberfläche eine Säurebildung und somit ein Farbumschlag. Da Ps. denitrificans, Ps. nigrificiens und Ps. alcaligenes Glukose nicht oxydativ

spalten, werden sie bei der Differenzierung im HUGH-LEIFSON-Medium mit Traubenzuckerzusatz nicht erfasst.

Die Cytochromoxydasereaktion und die Art des Glukoseabbaus wird auch von SCHUBERT⁵⁹ zur Differenzierung von Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae und Achromobacteriaceae als besonders wichtig angesehen.

Die Cytochromoxydasereaktion (auch Oxydasereaktion, Indophenolblau-Reaktion oder Nadi-Reaktion genannt) wurde 1885 erstmals von EHRLICH angewandt (WAGNER⁷⁰). GABY und HADLEY¹⁶ verwendeten den Test zur Bestimmung von Ps. aeruginosa.

KOVACS⁴⁰ vereinfacht die Technik des Cytochromoxydase-Testes dahingehend, daß er eine Öse der zu untersuchenden Kolonie auf einem mit dem Reagenz getränkten Filterpapier verreibt. Nach KLINGE³⁶, STEEL⁶⁵ sowie PULVERER und KORTH^{51.a} ist die Cytochromoxydasereaktion bei allen Pseudomonaden positiv.

Nach PARK^{51.b} reicht das Vermögen von polar begeißelten, gramnegativen Stäbchen, Kohlenhydrate zu oxydieren und/oder fluoreszierende Stoffe zu bilden, aus, um das Genus Pseudomonas zu klassifizieren. Aufgrund des Verhaltens im HUGH-LEIFSON-Medium und der Oxydasereaktion sowie der Bildung von Pigmenten differenzierten SHEWAN und Mitarbeiter⁶² bewegliche gramnegative Keime. Bei positiver Oxydasereaktion und fehlender oder nur oxydativer Spaltung von Glukose wurden bewegliche, gramnegative Bakterien als Pseudomonaden bezeichnet, bei fermentativer Glukosespaltung als Vibrionen oder Aeromonaden, welche dann aufgrund des Vermögens zur Gasbildung bei 20°C und der Empfindlichkeit gegenüber dem Vibriostatikum o/129 genauer bestimmt wurden.

2.12 Pseudomonas aeruginosa: (SCHROETER, 1872) (MIGULA, 1900)

Nach BERGEY'S MANUAL⁴ besitzt Ps. aeruginosa folgende Eigenschaften:

Nährbouillon: deutliche Trübung mit dickem Oberflächenhäutchen und erheblichem Sediment. Das Medium wird gelbgrün bis blau verfärbt und zeigt Fluoreszenz. Häufig wird Pyocyanin und Fluorescein gebildet.

Lackmusmilch: Bildung eines weichen Koagulums, schnelle Peptonisierung und Reduzierung, Reaktion alkalisch.

Glukose wird nicht fermentiert. Optimale Temperatur ist 37°C, gutes Wachstum bei 42°C.

In Übereinstimmung und Ergänzung dazu charakterisiert KIELWEIN^{30, 32} Ps. aeruginosa wie folgt:

Oxydative Spaltung von Glukose im HUGH-LEIFSON-Medium. Die Cytochromoxydasereaktion ist positiv; Fluorescein wird gebildet. Lackmusmilch wird zur Gerinnung gebracht, peptonisiert und alkalisiert.

Auf Nähragar wachsen die Stämme in leicht glasigen Kolonien mit strukturiertem Zentrum und unregelmäßigem Rand. Auf Blutagar sind die Stämme graugrün bis graubraun oder metallisch glänzend und bilden Hämolyse unterschiedlicher Stärke. Wachstum bei 42°C. Gelatine und Kasein werden gespalten. Die Bildung von Pyocyanin ist kein konstantes Merkmal. Acetamid wird gespalten.

TILL⁶⁸ wies bei 40 von ihm charakterisierten Ps. aeruginosa-Kulturen nach, daß diese Pseudomonaden durch eine quantitative Katalasebestimmung nach ROEDER⁵⁵ von anderen Pseudomonaden unterschieden werden können.

Hinsichtlich der Angaben über die Spaltung von Zuckern stimmen die Angaben von KIELWEIN³⁰, KLINGE³⁶ und TILL⁶⁸ überein.

JESSEN²⁷ gibt für die Spezies Ps. aeruginosa folgende Eigenschaften an:

Vollständige Reduktion von Nitraten, Verflüssigung von Gelatine, Wachstum bei 42°C, kein Wachstum bei 5°C, negative Eigelbreaktion, Säure- oder keine Säurebildung aus Mannit, monotriche Begeißelung.

Nach STANIER u. Mit.⁶⁴ sind zur Abgrenzung von Ps. aeruginosa gegenüber Ps. fluorescens folgende Merkmale wichtig: Monotriche Begeißelung, Pyocyaninbildung, kein Wachstum bei 4°C, Wachstum bei 41°C.

2.13

Pseudomonas fluorescens: (MIGULA, 1895)

Nach BERGEY'S MANUAL⁴ sind folgende Eigenschaften für Ps. fluorescens als wesentlich zu bewerten:

Lackmuspapier wird alkalisiert, keine Koagulation. Indol wird nicht gebildet. Gelatine wird verflüssigt, Nitrate werden zu Nitriten und Ammoniak reduziert. Aus Glukose wird Säure gebildet. Blutserum wird verflüssigt. Aerobes Wachstum, optimale Wachstumstemperatur zwischen 20 und 25°C.

Nährbouillon: getrübt, flockig, mit gelb-grüner Haut und grünlich gefärbtem Sediment.

KLINGE³⁶ stellte fest, daß die Hämolyse bei Ps. fluorescens auf solche Stämme beschränkt war, die einen protostatischen-protoziden Wirkstoff bildeten. Ps. fluorescens soll sich von Ps. putida und Ps. aeruginosa durch eine positive Eigelbreaktion und die Spaltung von Gelatine unterscheiden.

KIELWEIN³² beschreibt Ps. fluorescens (1) wie folgt:

"Lackmusmilch wird zur Gerinnung gebracht, peptonisiert und alkalisiert. Auf Nähragar wachsen die Kolonien graugelb und glasig mit leicht erhabenem Zentrum und einer wenig abgesetzten breiten Randzone mit flachen Begrenzungsstreifen. Die auf Blutagar gewachsenen Kolonien sind graugelb und matt glänzend. Kein Wachstum bei 42°C. Gelatine und Kasein wurden gespalten. Die Cytochromoxydase ist positiv, Wachstum bei + 5°C, jedoch nicht bei 37°C. Pyocyanin wird nicht gebildet. Bildung von Säure aus Methanol, Äthanol, Fruktose, Mannit und Rhamnose. Keine Säurebildung aus Laktose und Raffinose."

Die Angaben von LYSENKO⁴⁵ zur Gelatineverflüssigung und Kaseinspaltung stimmen mit denen von KIELWEIN³² überein. In Lackmusmilch konnte er jedoch nur eine Reduktion beobachten.

KIELWEIN³² unterscheidet zwischen hämolysierenden und nicht hämolysierenden Kulturen von Ps. fluorescens. Innerhalb der Gruppe der nicht hämolysierenden Kulturen konnte er aufgrund der Kulturmorphologie eine weitere Unterscheidung in 2 Untergruppen treffen. Da jedoch die biochemischen Eigenschaften der Kulturen innerhalb dieser beiden Gruppen nur geringfügige Unterschiede aufwiesen und außerdem auch die hämolysierenden Kulturen sich nach ihren biochemischen Eigenschaften nicht eindeutig von den nicht hämolysierenden Kulturen abtrennen liessen, fasst er alle Gruppen in der einen Spezies Ps. fluorescens zusammen. Die hämolysierenden Kulturen bezeichnet er als Ps. fluorescens var. haemolytica.

2.14

Pseudomonas myxogenes (FUHRMANN 1907) ist in BERGEY'S MANUAL⁴ wie folgt charakterisiert:

Nähragar: kreisförmige, erhabene, glatte, amorphe Kolonien.

Nährbouillon: Trübung mit schleimig-weißem Sediment.

Lackmusmilch: flockige Ausfällung, langsame Peptonisation mit Gelbfärbung des Serums und Alkalisierung. Nitrite werden bis zu Ammoniak reduziert. Fakultativ aerobes Wachstum, schwaches Wachstum bei 35°C.

Nach KIELWEIN³² ist Ps. myxogenes durch folgende Eigenschaften charakterisiert:

Lackmusmilch wird zur Gerinnung gebracht, peptonisiert und alkalisiert. Auf Nähragar werden grau-gelbe, glasige Kolonien mit wallartigem, erhabenem Rand und einem Geruch nach KCN gebildet. Auf Blutagar sind die Kolonien schleimig, grau-gelb und glänzend, ohne Hämolysebildung. Kein Wachstum bei 42°C. Gelatineverflüssigung und Kaseinspaltung.

Positive Cytochromoxydasereaktion und Fluoreszeinbildung. Wachstum bei 5°C, jedoch nicht bei 37°C. Pyocyanin wird nicht gebildet.

Nach Ansicht von KLINGE³⁶ sind Ps. fluorescens und Ps. myxogenes identisch. KIELWEIN³² schließt sich dieser Meinung an und schlägt vor, die Kulturen von Ps. myxogenes der Spezies Ps. fluorescens zuzuordnen und als Ps. fluorescens variatio myxogenes zu bezeichnen.

2.15

Pseudomonas putida (TREVISAN, 1889) (MIGULA, 1895)

Die hauptsächlichsten Merkmale von Ps. putida sind nach BERGEY'S MANUAL⁴:

Nährbouillon: fluoreszierende Trübung. Lackmusmilch: unverändert. Keine Indolbildung, Nitrat wird zu Nitrit gespalten,

Wachstum fakultativ anaerob, Wachstumsoptimum 25°C , wächst auch bei 37°C .

In der Koloniemorphologie und bei der Säurebildung aus Zuckern und Alkoholen konnte KLINGE³⁶ zwischen Ps. putida und Ps. fluorescens keinen Unterschied finden. Weitere Unterscheidungsmerkmale gegenüber Ps. fluorescens erkannte er im Unvermögen zur Gelatinespaltung und in der geringgradigen Veränderung der Lackmusmilch, die nur selten alkalisiert wurde. Ps. putida zeigte kein Wachstum bei 37°C . Fluoreszein wurde gebildet.

TILL⁶⁸ und KIELWEIN³² teilen aufgrund ihrer übereinstimmenden Untersuchungsergebnisse Ps. putida in 2 Gruppen ein:

1. Pseudomonas putida (1):

Lackmusmilch wird stark alkalisiert und von unten langsam reduziert. Auf Nähragar wachsen die Stämme in matt glänzenden, gelb pigmentierten glasigen Kolonien mit leicht erhabenem Zentrum. Der Geruch der Kulturen ist dumpf und leicht faulig. Die auf Blutagar gebildeten Kolonien sind matt glänzend und gelb pigmentiert; keine Hämolyse; sonst wie auf Nähragar. Kein Wachstum bei 42°C . Keine Gelatineverflüssigung und keine Kaseinspaltung. Keine Pyocyandinbildung. Über 80 % der Stämme bildeten Fluoreszein.

2. Pseudomonas putida (2):

Ps. putida (2) unterscheidet sich von Ps. putida (1) dadurch, daß er auf Blutagar grau-weiß erhabene, halbkugelförmige Kolonien, die einen stark fauligen Geruch entwickeln, bildet. Auf Nähragar wachsen die Stämme in grau-weiß glänzenden, trüben Kolonien, die in den übrigen Eigenschaften mit den auf Blutagar gewachsenen Kolonien übereinstimmen.

STANIER u. Mit.⁶⁴ unterteilen die Spezies Ps. putida in 2 Biotypen A und B. Auch KIELWEIN^{28, 32} und TILL⁶⁸ konnten für Ps. putida 2 Typen ermitteln. KIELWEIN³² schlägt vor, beide Typen als Ps. putida zusammenzufassen, wobei die gelbpigmentierte Type als Ps. putida var. lutea bezeichnet werden soll.

2.16 Pseudomonas taetrolens (HAYNES)

In BERGEY'S MANUAL⁴ sind nachstehende Eigenschaften angegeben:

Nährbouillon: Trübung, dünne ölige Haut und Sediment, Geruch nach Most. Lackmusmilch: Säuerung, Gerinnung, Reduktion. Keine Indolbildung, aus Nitrat keine Nitritbildung. Schwefelwasserstoff wird gebildet, Stärke nicht gespalten.

Säure, aber kein Gas, wird aus Glukose, Laktose, Galaktose, Mannose, Fruktose, Rhamnose und Xylose gebildet. Aerobes Wachstum, Katalase positiv. Optimale Wachstumstemperatur zwischen 23⁰ und 25⁰C, geringes Wachstum bei 33⁰ und 10⁰C.

LYSENKO⁴⁵ charakterisiert Ps. taetrolens wie folgt:

Reduktion von Lackmusmilch, keine Gelatinespaltung, Reduzierung von Nitrat, keine Ureasebildung. Säurebildung aus Galaktose, Glukose, Glyzerin und Mannit. Katalase positiv, keine Indolbildung, keine Lipasebildung, keine Bildung von Fluoreszeïn.

KIELWEIN³² und TILL⁶⁸ fanden übereinstimmend, daß Ps. taetrolens Lackmusmilch zur Gerinnung bringt und säuert. Auf Nähragar bildet sie gelbgrüne, glasige Kolonien mit scharf abgesetztem und sehr schmalem Rand, die einen Geruch von rohen Kartoffeln aufweisen. Auf Blutagar bilden die Stämme graugrüne, flache Kolonien, die in den übrigen Eigenschaften mit den auf Nähragar gewachsenen Kolonien übereinstimmen.

Keine Bildung von Hämolyisin. Kein Wachstum bei 42⁰C.

Keine Gelatineverflüssigung, keine Kaseinspaltung.

Cytochromoxydasebildung positiv. Wachstum bei + 5⁰C,

jedoch nicht bei + 37⁰C. Keine Pyocyaninbildung.

2.17

Pseudomonas fragi (EICHHOLZ, 1902) (HUSS, 1907)

HUSSON, LONG und HAMMER²⁶ beschreiben Ps. fragi in
BERGEY'S MANUAL wie folgt:

Nährbouillon: getrübt, Sediment, dünne Haut. Lackmusmilch:
nach Säuregerinnung Bildung eines roten Ringes an der Ober-
fläche, vollständige Gerinnung nach 2 bis 3 Wochen, manch-
mal Verdauung. Charakteristischer Geruch nach Erdbeeren.

Keine Indolbildung. Nitrat wird nicht zu Nitrit reduziert.

Ammoniak wird aus Pepton gebildet, Säurebildung aus Glukose
und Galaktose. Gelatineverflüssigung, Fettspaltung. Aerobes
Wachstum, Vermehrung zwischen 10⁰ und 30⁰C, kein Wachstum
bei 37⁰C.

LYSENKO⁴⁵ beobachtete Säurebildung aus Galaktose und Glukose,
nicht dagegen aus Glyzerin und Mannit. Lackmusmilch wird nach
seinen Angaben alkalisiert, Gelatine und Kasein nicht gespalten,
Lipase jedoch gebildet.

Aufgrund der Ergebnisse von KIELWEIN³² und TILL⁶⁸ läßt sich
Ps. fragi folgendermaßen charakterisieren:

Lackmusmilch wird zur Gerinnung gebracht und gesäuert. Auf
Nähragar werden graugelbe, glasige Kolonien mit flach erhabenem
Zentrum und schmalem abgesetztem Rand gebildet. Auf Blutagar
bilden die Stämme graugelbe, matt glänzende Kolonien. Alle Kul-
turen bilden kein Hämolyisin. Kein Wachstum bei 42⁰C. Gelatine-
verflüssigung, aber keine Kaseinspaltung. Keine Pyocyaninbildung.

Über 80 % der Stämme bilden kein Fluoreszein, Cytochromoxydase positiv. Aus Glukose, Maltose, Mannose und Galaktose wird Säure gebildet.

2.18

Weitere in Milch nachgewiesene Pseudomonaden

KIELWEIN³² fand bei der Differenzierung und Charakterisierung von 272 Pseudomonas-Kulturen drei unter sich einheitliche Gruppen, die nicht in bekannte Spezies einzuordnen waren. Er bezeichnet diese nicht identifizierten Kulturen als Ps. species (1), (2) und (3), für die er die folgenden charakteristischen Merkmale angibt:

1. Pseudomonas species (1)

Lackmuspilch wird zur Gerinnung gebracht, schnell und vollständig reduziert, peptonisiert und alkalisiert. Auf Nähragar wachsen die Stämme in graugelben, matt glänzenden, leicht trüben Kolonien mit erhabenem Zentrum. Auf Blutagar bilden die Stämme graugrüne, leicht schleimige, glänzende Kolonien. In ihren übrigen Eigenschaften stimmen sie mit den auf Nähragar gewachsenen Kolonien überein. Kein Wachstum bei 42°C, Gelatine wird verflüssigt, Kasein gespalten und Cytochromoxydase gebildet. Keine Pyocyandinbildung.

KIELWEIN³² schlägt vor, Ps. species (1) als Ps. caseolytica zu bezeichnen, sofern noch keine Beschreibung dieser Spezies vorliegt.

2. Pseudomonas species (2)

Lackmusmilch wird grobsinnlich feststellbar nicht verändert. Die Reaktion ist entweder leicht sauer oder leicht alkalisch. Die Lackmusmilch entwickelt einen ranzigen Geruch. Auf Nähragar wachsen die Stämme in leicht erhabenen, grau-weißen, glänzenden, trüb-glasigen Kolonien, mit erhabenem Zentrum. Auf Blutagar bilden die Kulturen graugelb-grüne, schleimig glänzende Kolonien. Kein Wachstum bei 42^o C. Keine Gelatineverflüssigung und Kaseinspaltung. Cytochromoxydase positiv, Wachstum bei + 5^o C. Keine Pyocyaninbildung.

3. Pseudomonas species (3)

KIELWEIN³³ gibt für die bisher nicht einzuordnende Pseudomonas-Species folgende Merkmale an:

Cytochromoxydasereaktion positiv, aerobe Glukosespaltung. Lackmusmilch: Alkalisierung und geringgradige Gerinnung. Keine Gelatineverflüssigung und keine Kaseolyse. Kein Wachstum bei 42^o C. Säure wird gebildet aus Adonit, Dextrin, Dulcit, Laktose, Maltose und Mannit. Als wesentliches Unterscheidungsmerkmal gegenüber anderen Pseudomonas-Arten ist die Aeskulinspaltung zu werten.

2.2 Die Differenzierung und Charakterisierung von Aeromonaden.

In BERGEY'S MANUAL⁴ werden folgende 4 Spezies von Aeromonas aufgeführt:

Ae. liquefaciens

Ae. punctata

Ae. hydrophila

Ae. salmonicida

Nach CASELITZ⁷ sollen die 3 in BERGEY'S MANUAL angeführten Spezies Ae. liquefaciens, Ae. punctata und Ae. hydrophila eine einzige darstellen, für die CASELITZ die Bezeichnung Ae. hydrophila verwendet. Stämme, die Glukose fermentativ spalten, aber kein Gas bilden, werden vielfach als Ae. formi cans bezeichnet. CASELITZ und GÜNTHER⁸ beschreiben die aus Glukose Säure und Gas bildenden Aeromonaden wie folgt:

"Es handelt sich um gramnegative, gerade oder leicht gebogene, lateral oder polar, im allgemeinen monotrich begeißelte Stäbchen, die aus Glukose Säure und Gas bilden, über hämolytische und proteolytische Eigenschaften verfügen und aufgrund ihrer biochemischen Leistungen in verschiedene Typen unterteilt werden können."

EWING und Mit.^{14.b} stellen folgende 3 Spezies des Genus Aeromonas auf:

Ae. hydrophila

Ae. salmonicida

Ae. shigelloides

CASELITZ⁷ schließt sich der Auffassung von EWING und Mit. an und schlägt ergänzend dazu vor, die anaerogenen Aeromonaden der Spezies Ae. hydrophila unterzuordnen und empfiehlt die Bezeichnung Ae. hydrophila variatio anaerogenes.

KIELWEIN³² kommt aufgrund eigener Untersuchungen zur selben Einteilung der Aeromonaden wie CASELITZ⁷.

SCHUBERT⁶⁰ stellte ausgedehnte Versuche mit der VOGES-PROSKAUER-Reaktion an. Er teilte die VOGES-PROSKAUER-negativen Ae. hydrophila-Stämme in solche ein, die Meso-2,3-Butandiol zu Acetoin und Diacetyl dehydrieren und Gas aus Glyzerin bilden und in solche, die eine negative Meso-2,3-Butandiol-Reaktion ergeben und aus Glyzerin kein Gas bilden.

Ebenso unterschied er bei den VOGES-PROSKAUER-negativen Stämmen der anaerogenen Aeromonaden zwischen solchen Stämmen, die Meso-2,3-Butandiol spalten oder nicht spalten.

SCHUBERT⁶¹ ordnet der Gattung Aeromonas folgende Spezies, bzw. Subspezies zu:

1. Aeromonas hydrophila
2. Aeromonas hydrophila subsp. anaerogenes
3. Aeromonas punctata
4. Aeromonas punctata subsp. caviae
- 5.-7. noch weitere, milchhygienisch nicht bedeutende Spezies.

Die Unterscheidung der 4 angeführten Spezies, bzw. Subspezies, erfolgt nach SCHUBERT⁶¹ nach folgendem Schlüssel:

	1.	2.	3.	4.
Gasbildung aus Glukose	+	-	+	-
Butandiol-dehydrogenase-Reaktion	+	+	-	-

KIELWEIN u. Mit.³¹ erzielten in Versuchen zur bakteriologischen Charakterisierung der Aeromonaden mit der Literatur weitgehend übereinstimmende Ergebnisse.

2.3

Die Anzüchtung von Pseudomonaden und Aeromonaden

Bei der Anzüchtung psychrotropher Pseudomonaden wurde versucht, diese aufgrund ihrer Fähigkeit, bei + 5 - 7°C zu wachsen, zu isolieren (WITTER⁷²). Da die hierbei notwendigen Bebrütungszeiten für die Praxis zu lang waren, züchteten DRUCE u. Mit.¹³, ELLIKER^{14. a} und COLLINS⁹ auf Violet-Red-Bile-Agar selektiv bestimmte Pseudomonasstämme. Andere Autoren^{53, 63} hemmten die grampositive Begleitflora mit Penicillin bzw. mit Kristallviolett.

KUHLENBERG u. Mit. (zit. bei KIELWEIN³²) verbesserten den Selektionserfolg von Kristallviolett durch Zusatz von Ammoniumlaktat zum Agar. NIKODEMUSZ⁴⁹, KORTH³⁹ und KIELWEIN^{28, 29} selektierten Pseudomonaden und Aeromonaden mit Nährböden, welche nur von diesen verwertbare Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthielten. So arbeitete KORTH³⁹ mit einer Salzlösung, der Chinsäure als einzige Kohlenstoffquelle zugesetzt worden war, um Ps. aeruginosa anzuzüchten. Diesen Nährboden modifizierte KIELWEIN²⁹ zu einem festen. Außerdem verwendete er zur Hemmung der Begleitflora Penicillin.

Später ging KIELWEIN²⁹ dazu über, Natriumglutamat als einzige von Pseudomonaden und Aeromonaden auszuwertende Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu verwenden. Durch Zusatz von Stärke und Phenolrot ist das GSP-Medium auch zur Anzüchtung von Aeromonaden geeignet. Zur Hemmung eventuell ebenfalls wachsender Enterobacteriaceae setzte er dem Medium Penicillin zu. Durch die verwendete Konzentration von 100 IE Penicillin-G-Natrium pro ml Nährmedium wird allerdings auch Ps. stutzeri gehemmt.

Andere Autoren versuchten die selektive Züchtung von Ps. aeruginosa durch Zusatz von Malachitgrün (HABS und KIRSCHNER²⁰), Cetyltrimethylammoniumbromid (LOWBURY⁴⁴), Brilliantgrün (WINKLE⁷¹), Alcylylsulfonat und seleniger Säure (LINDE und GRUHN⁴²) zu Standardnährböden.

2.4

Das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden

Nach BERGEY'S MANUAL⁴ sind die Hauptfundorte für Pseudomonaden der Boden, Meerwasser und verunreinigtes Süßwasser sowie Pflanzen und Tiere. Auch KLINGE³⁵ bezeichnet die Pseudomonaden als Boden- und Wasserkeime. Nach THOMAS⁶⁶ gehören die Pseudomonaden zur Normalflora von Wasser. Bei Untersuchung von Wasserproben aus dem Bodensee fand DEUFEL¹² in solchen Proben, die im

freien See gezogen wurden, in rund 50 % der Fälle Pseudomonaden, in Proben aus der Uferzone in mehr als 95 % Ps. fluorescens und Ps. putida.

Da ein Großteil der Pseudomonaden die biologische Sperre des Bodens gegenüber Bakterien beim Versickern der Oberflächenwasser überwindet, muß nach KNORR, HAAS und KNORR³⁸ immer mit dem Vorkommen von Pseudomonaden im Trinkwasser gerechnet werden. Besonders häufig findet sich die hämolytische Form von Ps. fluorescens, die über protostatische oder protozide Substanzen verfügt und somit von Protozoen nicht phagozytiert werden kann. Nach CASELITZ⁷ werden Pseudomonaden im Wasser, Abwasser, Aborten, Düngergruben und Jauche häufig nachgewiesen. Da man früher überzeugt war, daß Ps. aeruginosa und Ps. fluorescens nicht von einander abzutrennen wären (LODE⁴³), wurde lange Zeit die Auffassung vertreten, daß Ps. aeruginosa ein echter Wasserkeim sein müsse, der auch aus reinen Quellen, bei denen eine jegliche Verunreinigung ausgeschlossen werden konnte, zu isolieren war. Heute besteht kein Zweifel, daß wir als normalen Standort von Ps. aeruginosa Mensch und Tier anzusehen haben. Studien von RINGEN und DRAKE⁵⁴ bestätigen diese Auffassung.

In Wasserproben aus öffentlichen bzw. nichtöffentlichen Wasserversorgungen fand BEYTHIEN⁵ in 5,8 % bzw. 33,3 % der Proben über 10 Pseudomonaden pro ml. In 34 Proben aus öffentlichen Wasserversorgungsanlagen und 31 Proben aus Eigenwasserversorgungen (Membranfiltermethode) konnte KIELWEIN³² Pseudomonaden nachweisen. Der Nachweis von Ps. aeruginosa gelang nur aus einer Wasserprobe bei Eigenwasserversorgung. Ps. fragi wurde jeweils in nur einer Probe ermittelt. Der größte Teil der nachgewiesenen Pseudomonaden war Ps. fluorescens(1), (2) und (3) zuzuordnen. Der Anteil an Ps. putida war mit 36,4 % beachtlich.

RINGEN und DRAKE⁵⁴ konnten aus 80 Proben aus Bauernhofstaub (einschließlich Schaf-, Kuh- und Pferdekot) 2 Ps. aeruginosa-Stämme (= 2,5 %) und aus 52 Abwasserproben 47 Ps. aeruginosa-Stämme (= 90 %) isolieren.

THOMAS⁶⁶ wies in Milcherzeugerbetrieben Pseudomonaden auf der Euterhaut, auf Futtermitteln und in der Stallluft nach.

Beim Tier kann Ps. aeruginosa auch aus dem Kot gezüchtet werden, ohne dass Krankheiterscheinungen vorliegen (CASELITZ⁷).

HOADLEY und McCOY²³ fanden bei 9,45 % der von ihnen untersuchten Kotproben von Kälbern Ps. aeruginosa. In Proben von Milchkühen gelang der Nachweis nicht. Auffallend ist auch der hohe Prozentsatz der Ps. aeruginosa-Träger bei Hunden mit 27,4 %.

Aeromonaden wurden 1890 erstmalig von ZIMMERMANN (zit. nach CASELITZ⁷) aus dem Trinkwasser der Stadt Chemnitz isoliert.

Nach BERGEY'S MANUAL⁴ handelt es sich bei den Aeromonaden um typische Wasserkeime. KIELWEIN³² konnte in 2 von 34 Proben aus öffentlichen Wasserversorgungen Aeromonaden nachweisen.

2.5 Kontamination von Rohmilch mit Pseudomonaden und Aeromonaden

2.51 Vorkommen von Pseudomonaden in Rohmilch

GYLLENBERG und EKLUND¹⁹ fanden in den von ihnen untersuchten Rohmilchproben vorwiegend Ps. fluorescens, Ps. putrefaciens, Ps. fragi und Ps. aeruginosa. Dagegen konnte KUNDRAT⁴¹ Ps. fluorescens und Ps. fragi zahlenmäßig am häufigsten nachweisen. REHER⁵² identifizierte in 76 % der von ihm untersuchten Vorzugsmilchproben Ps. fluorescens.

KIELWEIN²⁸ fand in 68,4 % der von ihm untersuchten Rohmilchproben Pseudomonaden, aber in über 1000 Proben nur 6,7 % Ps. aeruginosa.

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangte TILL⁶⁸. Bei der Untersuchung von 1976 Rohmilchproben fand er in 66,9 % der Proben Pseudomonaden, die sich nach Arten wie folgt verteilten:

Ps. fluorescens 54,15 %, Ps. putida 27,3 %,
Ps. aeruginosa 10,23 %, Ps. myxogenes 5,15 %,
Ps. taetrolens 1,54 %, Ps. species 0,51 %.

NAKANISHI u. Mit.⁴⁷ wiesen neben anderen Keimen in 46,54 % der von ihnen untersuchten Milchproben Pseudomonaden nach.

Mit der Dauer der Kühlagerung von Rohmilch soll nach ORR u. Mit.⁵⁰ eine einseitige Erhöhung des Pseudomonaden-Anteils an der Milchflora auftreten. Dieser Ansicht schließt sich auch BEYTHIEN⁵ an.

KIELWEIN³² isolierte aus 159 Rohmilchproben folgende Pseudomonas-Arten:

	<u>Anzahl</u>	<u>%</u>	
Ps. fluorescens (1)	26	17,5	} 42,3 %
Ps. fluorescens (2)	14	8,7	
Ps. fluorescens (3)	17	10,6	
Ps. myxogenes	9	5,5	
Ps. putida (1)	5	3,1	} 39,4 %
Ps. putida (2)	58	36,3	
Ps. aeruginosa	14	8,7	
Ps. taetrolens	5	3,1	
Ps. fragi	1	0,6	
Ps. species (1)	4	2,3	
Ps. species (2)	6	3,7	
	<u>150</u>	<u>100</u>	

Weitere 1012 Rohmilchproben untersuchte KIELWEIN³² im Anreicherungsverfahren auf Ps. aeruginosa, die er aus 11,3 % der Proben isolieren konnte. Dem stehen die Untersuchungsergebnisse von GRÜN¹⁸ gegenüber, der in 86,2 % der von ihm untersuchten Proben Ps. aeruginosa nachweisen konnte.

2.52

Das Vorkommen von Aeromonaden in Rohmilch

Über das Vorkommen von Aeromonaden in Rohmilch liegen wenige Berichte vor. BEYTHIEN⁵ isolierte aus 101 Rohmilchproben 34 Aeromonadenkulturen. KIELWEIN u. Mit.³¹ isolierten mittels des Stärke-Phenolrot-Mediums aus 17,1 % der überprüften 1248 Rohmilchproben Aeromonaden.

KIELWEIN³² konnte bei späteren Untersuchungen mit dem GSP-Medium in 37,2 % von 175 Rohmilchproben Aeromonaden nachweisen.

Von 59 aus Rohmilch isolierten Aeromonaden identifizierte er 3 als Ae. hydrophila (Meso-2,3-butandiol-dehydrogenase positiv) und 56 als Ae. hydrophila var. anaerogenes (davon 7 mit positiver Meso-2,3-butandiol-dehydrogenase-Reaktion).

2.6

Der Keimgehalt der Stallluft

BARTA² ermittelte in Kuhställen im Absetzverfahren Bakterien- und Staubzahlen und kam zu dem Schluß, daß die Beziehung zwischen Bakterienzahl und Staubpartikeln nur gering ist.

HILLIGER²² leitete aus seinen Beobachtungen ab, daß staubreiche Stallluft relativ bakterienärmer ist als staubarme. BUROW und HILLIGER⁶ exponierten Nähragarplatten in Kuhställen für je 30 Sekunden und zählten die gewachsenen Kolonien nach einer Bebrütung

von 24 Stunden bei 37°C . Sie ermittelten während der Stallruhe durchschnittlich $1,2 \text{ Bakterien/cm}^2 \cdot \text{min}$, während der Fütterung $2,1 \text{ Bakterien/cm}^2 \cdot \text{min}$.

BARTA² fand in Kuhställen zu verschiedenen Zeiten $0,8 - 13,7 \text{ Bakterien/cm}^2 \cdot \text{min}$.

HURTIENNE²⁵ ermittelte in Kuhställen während der Ruhezeit $1,0 (0,5 - 1,7) \text{ Keime/cm}^2 \cdot \text{min}$.

Ursachen für die abweichenden Werte der einzelnen Autoren dürften nach BUROW und HILLIGER⁶ in der unterschiedlichen Stalleinrichtung, Stallführung und Untersuchungstechnik sowie Jahreszeitunterschieden zu suchen sein.

ASAJ¹ (zit. bei HURTIENNE) gibt für Großtierstallungen Keimzahlen zwischen 39 und 3333 pro Platte pro Minute an. Den Minimalwert fand HURTIENNE²⁵ in seinen Versuchen bestätigt, während seine Maximalwerte nur $1/30$ der von ASAJ angegebenen Daten erreichen. In Schweineställen fand GORDON¹⁷ Keimzahlen zwischen 34 und 8808 pro Platte pro Minute.

2.61

Verfahren zur Ermittlung der Luftkeime

Nach HAHN (1930) (zit. bei HURTIENNE²⁵) geht die Methode der Sedimentation auf ROBERT KOCH (1881) zurück. Dieses sog. KOCH'sche Absetzverfahren beruht auf der Sedimentation von Partikeln bestimmter Größe - und somit auch von an Staubteilen gebundenen Bakterien - auf offen aufgestellte Nährböden, wobei in der Regel das Luftvolumen nicht bestimmt wird. Die Expositionsdauer der Platten variiert je nach Keimgehalt der Luft von Sekunden bis Stunden.

In der Humanmedizin findet das KOCH'sche Plattenverfahren verbreitet Anwendung zur Feststellung des hygienischen Status in Krankenhäusern, wobei KLEIN und WERNER³⁴ beobachteten, daß Platten, die mehr als 120 cm über dem Boden aufgestellt waren, deutlich weniger Keime pro Platte aufwiesen.

Zusammenstellungen über weitere Verfahren zur Luftkeimbestimmung finden sich bei HURTIENNE²⁵, BUROW und HILLIGER⁶, KNOCHE³⁷ und SCHÖNHERR⁵⁶.

2.62

Die Luftkeimuntersuchung beeinflussende Faktoren

Nach KNOCHE³⁷ rechnen hierzu in erster Linie klimatische Faktoren wie Temperatur, relative Feuchte und Luftgeschwindigkeit. Ferner sind von Einfluß die Verarbeitung der Proben, die Art des Nährmediums, die Verimpfungsmenge und -technik sowie die Bebrütungstemperatur.

- 3.0 Eigene Untersuchungen
- 3.1 Material und Methoden
- 3.11 M a t e r i a l
- 3.111 Herkunft der untersuchten Proben

In 35 Milchviehställen im Hartkäsegebiet des württembergischen Allgäus wurden jeweils folgende Proben gezogen:

4 Abklatschproben von der Stallwand mit einer Fläche von je $2 \times 5 \text{ cm}^2$; je 2 Tupperproben aus Tränkevorrichtung, Futtertrog, Futtergang, Liegeplatz und Euter; 2 Kotproben. Außerdem wurden je Stall 4 GSP-Agar-Platten (Durchmesser 88 mm) zur Feststellung von Luftkeimen im Sedimentationsverfahren aufgestellt.

Tabelle 1: Herkunft der Proben

<u>Herkunft</u>	<u>Anzahl</u>
Wand	137
Tränke	69
Futtertrog	70
Futtergang	68
Liegeplatz der Kühe	70
Euteroberfläche	42
Kotproben	57
Luft (Sedimentationsproben)	138
Zusammen	651

In 8 entsprechend eingerichteten Milcherzeugerbetrieben wurden ergänzend Sedimentationsproben auch in den Milchkammern gezogen.

3.112

Nährböden und Reagenzien

1. Glutaminat-Stärke-Phenolrot (GSP-Agar nach KIELWEIN²⁹)
Zur Unterdrückung der Pilzflora wurde dem Nährmedium
1 % Pimafulin⁺ zugefügt. 1 ml Pimafulin⁺ enthält 20 mg
Pimaricin.
2. Nähragar mit 1 % Fleischextrakt, 0,3 % Hefeextrakt und
0,1 % Glukose.
3. Blutagar mit 8 % Rinderblut, 0,1 % Glukose und 50 IE
Penicillin-G-Natrium je ml.
4. Nährboden nach PULVERER und KORTH^{51. a} zum Farbstoff-
nachweis.
5. Nährgelatine
6. Lackmusmilch (HALLMANN²¹)
7. Kaseinagar nach FRAZIER und RUPP¹⁵
8. HUGH-LEIFSON Medium²⁴ mit Zusatz von D-Glukose, Glycerin
und Xylose.
9. Arginindchydogenase-Medium nach MØLLER⁴⁶.
10. Glutaminat-Medium nach KIELWEIN (flüssig)
mit folgender Zusammensetzung:

2,0 KH_2PO_4
0,5 MgSO_4
10,0 Na-Glutaminat
ad 1000,0 Aqua.dest.
pH 7,2

⁺ royal netherlands fermentation industries ltd.,
delft-holland.

11. Nährbouillon zur Prüfung der Spaltung von Glukose
(mit Gärröhrchen) (1 %iger Zusatz) in der von
SCHUBERT⁵⁷ angegebenen Zusammensetzung.
12. Cytochromoxydasereagenz:
Mischung einer 1 %igen, wässrigen N, N-Dimethyl-p-
phenylen-diammonium-dichlorid-Lösung (Merck-Artikel
Nr. 3067) mit einer 1 %igen, alkoholischen Lösung von
Alpha-Naphtol (SERVA, Katalog-Nr. 29975) im Verhältnis
3 : 2 (CASELITZ⁷).
13. Katalasereagenz nach ROEDER⁵⁵.

Anmerkung: Die Merck-Artikelnummern beziehen sich
auf den Katalog 1966, die SERVA-Artikel-
nummern auf den Katalog von 1968.

3.12 Methoden

3.121 Vorversuche:

Da aufgrund des Ortes der Probenahmen ein starker Gehalt der Proben an Schimmelpilzen zu erwarten war, wurden für die Mycostatica Pimafucin 2 % und Actidione die Konzentration ermittelt, die Schimmelpilze zwar hemmte, aber Pseudomonaden und Aeromonaden in ihrem Wachstum nicht negativ beeinflusste.

Actidione wurde in Konzentrationen von 1, 10, 100 und 1.000 mcg/ml Nährboden und Pimafucin mit Mengen von 0,4, 0,8 und 1,6 ml Suspension pro 100 ml Nährmedium den mit Pseudomonaden, bzw. mit Schimmelpilzen beimpften GSP-Nährböden zugesetzt.

Außerdem wurden zu verschiedenen Tageszeiten (Stallruhe und Fütterungszeit) GSP-Agar-Platten (Durchmesser 88 mm) verschieden lang (5, 15, 30, 45 und 60 Minuten) offen aufgestellt, um die Zeitspanne zu ermitteln, in der eine angemessene, aber nicht unübersichtlich große Anzahl von Keimen auf sie sedimentierten.

3.122 Die Probenahme

Von den Wänden wurden je Stall 4 Proben mittels $2 \times 5 \text{ cm}^2$ großer Demeter-Bügel gewonnen, die GSP-Agar enthielten. Somit war ein direkter Abklatsch auf den Nährboden möglich.

Aus dem grob gesäuberten Tränkebecken und dem Futtertrog, vom Futtergang, vom Liegeplatz und von der Euteroberfläche

von je 1 - 2 Kühen wurden Tupferproben mit angefeuchteten, sterilen Zellstoffstopfen gezogen. Mit diesen wurde anschließend ein Reagenzglas verschlossen, das 10 ml steriles Aqua dest. enthielt. Durch kräftiges Schütteln wurden die Tupferproben in das sterile Aqua dest. ausgewaschen. Die Proben wurden auf 2° bis 4°C gekühlt ins Labor transportiert und dort binnen 12 Std. nach der Probenahme untersucht. Hierzu wurden jeweils 0,1 ml der Probensuspension auf GSP-Nährboden ausgespatelt und 0,5 ml in ein flüssiges Glutaminat-Medium pipettiert.

Die Kotproben wurden in sterilen Plastik-Petrischalen gekühlt ins Labor gebracht. Jeweils 1 g Kot wurde in 100 ml Aqua dest. aufgeschwemmt und entsprechende Mengen der Suspension wie bei den anderen Proben (s. o.) auf GSP-Agar, bzw. in flüssiges GSP-Medium verbracht.

Zur Feststellung des Luftkeimgehaltes im Absetzverfahren wurden während der Stallruhe an 4 verschiedenen, willkürlich ausgewählten Stellen im Stall je eine GSP-Platte für 45 Min. exponiert.

3.123

Bakteriologische Untersuchungsmethoden

1. Kulturmorphologie und Hämolysebildung:

Hierzu wurden die Kulturen auf in Petrischalen erstarrten Blutagar und Nähragar übertragen und nach 2-tägiger Bebrütung bei 25°C makroskopisch beurteilt.

2. Cytochromoxydasereaktion:

Es wurde die Technik von KOVACS⁴⁰ verwendet.

3. Farbstoffnachweis:

Die Kulturen wurden im Nährmedium nach PULVERER und KORTH^{51. a} für 5 Tage bei 25°C bebrütet. Unter einer UV-Lampe wurden die Kulturen auf das Vorhandensein von Fluoreszein untersucht. Zur Feststellung von Pyocyanin wurden die Kulturen mit Chloroform ausgeschüttelt, wobei das gegebenenfalls vorhandene Pyocyanin im absetzenden Chloroform gelöst wurde.

4. Gelatineverflüssigung

Die stichförmig beimpfte, bei 25°C bebrütete Nährgelatine wurde am 21. Tag nach Abkühlung überprüft.

5. Wachstum in Lackmusmilch

Die Beimpfung erfolgt von festen Nährböden aus. Die bei 25°C bebrüteten Lackmusmilchkulturen wurden am 7. und 14. Tag auf Gerinnung, Peptonisierung, Reduktion und pH-Wert-Verschiebung geprüft.

6. Prüfung auf Kaseolyse:

In den in Petrischalen erstarrten Kaseinagar nach FRAZIER und RUPP¹⁵ wurden Löcher mit einem Durchmesser von 0,5 cm ausgestanzt, in die jeweils 0,1 ml Lackmusmilchkultur-Überstand gegeben wurde. Nach 24stündigem Aufenthalt bei Zimmertemperatur wurde geprüft, ob sich eine deutliche Klärungszone gebildet hatte.

7. Katalasebildung:

Die quantitative Katalasebestimmung wurde in Katalaseröhrchen nach ROEDER⁵⁵ durchgeführt. Hierzu wurden die Röhrchen bis zur unteren Ringmarke mit 24 stündigen Bouillonkulturen, die 1 : 10 mit sterilem Aqua dest. verdünnt waren, gefüllt. Bis zur mittleren Ringmarke wurde dann Katalasereagenz nach ROEDER zugegeben. Die Menge des freigesetzten Sauerstoffs wurde nach 3 Stunden an der in die Röhrchen eingravierten Skala abgelesen.

8. Spaltung von Kohlenhydraten und Alkohol:

Die zu prüfenden Kohlenhydrate und Alkohole wurden dem autoklavierten HUGH-LEIFSON-Medium zugesetzt. Die Kulturen wurden stichförmig beimpft und am 1., 3. und 8. Tag nach der Beimpfung auf Wachstum und Säurebildung überprüft.

9. Arginindehydrogenasereaktion:

Diese Prüfung erfolgte nach der Vorschrift von MÖLLER⁴⁶.

10. Meso-2,3-Butandioldehydrogenasereaktion:

Diese Prüfung wurde nach der Vorschrift von SCHUBERT⁶⁰ durchgeführt.

11. Prüfung der Gasbildung aus Glukose:

erfolgt nach der von SCHUBERT⁵⁷ angegebenen Methode.

3.124

Methodik der Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung der Kulturen

1. Bebrütung der Kulturen: Die beimpften, festen Nährböden wurden für 3 Tage bei 25°C bebrütet. Das flüssige Glutaminat-Medium wurde für 3 Tage bei 37°C bebrütet.

2. Identifizierung der auf festen Nährböden gewachsenen Kulturen:

Von jeder sich morphologisch von den anderen unterscheidenden Kolonie wurde eine Subkultur auf Penicillin-Blut-Agar angelegt. Nach 2-tägiger Bebrütung dieser Subkulturen bei 25°C wurden die Kulturen auf Morphologie, Hämolyse und Verhalten in der Cytochromoxydase-Reaktion überprüft. Gleichzeitig mit der Anlage der Subkulturen wurde ein HUGH-LEIFSON-Medium mit einer Öse Koloniematerial stichförmig beimpft. Kulturen, die cytochromoxydase-

positiv oder -negativ reagierten und im HUGH-LEIFSON-Medium eine oxydative Glukosespaltung zeigten, wurden folgenden weiteren Prüfungen unterzogen:

1. Verhalten in Lackmusmilch. Nach 14tägiger Bebrütung bei 25^oC Feststellung der Veränderung und des pH-Wertes.
2. Wachstum auf Nähragar.
3. Untersuchung auf Gelatineverflüssigung.
4. Prüfung auf Kaseolyse (siehe 3.123 Nr. 6)
5. Prüfung auf Fluoreszein und Pyocyanin im Medium nach PULVERER und KORTH^{51.a}.

Die auf dem GSP-Nährmedium gewachsenen Stämme, die cytochromoxydasepositiv waren und Glukose fermentativ spalteten, wurden auf ihre Fähigkeit zur Arginindehydrogenasebildung (8 Tage Bebrütung bei 30^oC) geprüft und, sofern sie positiv reagierten, auf Gasbildung aus Glukose (8 Tage, 30^oC) und die Meso-2,3-Butandiolreaktion (2 Tage, 30^oC) untersucht.

3. Identifizierung der im flüssigen Glutaminat-Medium gewachsenen Kulturen.

Die im flüssigen Glutaminat-Medium bei 37^oC angereicherten Kulturen wurden nach Überimpfung auf Penicillin-Blut-Agar bei 25^oC 2 Tage auf ihr Verhalten in der Cytochromoxydase-Reaktion und oxydative Glukosespaltung geprüft. War die Cytochromoxydase-Reaktion positiv oder negativ und wurde Glukose im HUGH-LEIFSON-Medium oxydativ gespalten, erfolgte eine weitere Untersuchung der Stämme auf Farbstoff-(Fluoreszein und Pyocyanin)-Bildung und eine quantitative Katalasebestimmung nach ROEDER.

4. Charakterisierung und Differenzierung der Kulturen:

Die Stämme wurden dann aufgrund ihres Verhaltens in den oben beschriebenen Reaktionen charakterisiert und entsprechend den Angaben in Tabelle 2 und 3 differenziert.

Kulturen, die zur Glukosespaltung nicht befähigt waren, wurden nicht weiter differenziert. Kulturen mit negativem Verhalten in der Cytochromoxydase-Probe, die Glukose fermentativ spalteten, wurden den Enterobacteriaceae zugeordnet.

Tabelle 2: Differenzierungsschema für Pseudomonaden

	Cytochrom- oxydase	Glukose- Spaltung	Lackmus- milch	Gelatine- spaltung	Kaseolyse	Hämolyse	Nähr- agar	Katalase	Pyo- cyanin	Fluores- zein
<u>Ps. fluorescens (1)</u>	+	ox.	g, p, alk.	+	+	-			-	> 80 % +
<u>Ps. fluorescens (2)</u>	+	ox.	g, p, alk.	+	+	+			-	(+)
<u>Ps. myxogenes</u>	+	ox.	g, p, alk.	+	+	-	Wall, Geruch n. KCN		-	+
<u>Ps. putida (1)</u>	+	ox.	alk. +++ , red. v. unten	-	-	-	gelb		-	> 80 % +
<u>Ps. putida (2)</u>	+	(-)	alk. +++ , red. v. unten	-	-	-	weiß		-	(+)
<u>Ps. aeruginosa</u>	+	ox.	g, p, alk.	+	+	+		> 120	+	+
<u>Ps. taetrolens</u>	+	ox.	g, sauer	-	-	-			-	(+)
<u>Ps. fragi</u>	+	ox.	g, sauer	+	-	-			-	> 80 % +
<u>Ps. species (1)</u>	+	ox.	g, p, r, alk.	+	+	-			-	(+)
<u>Ps. species (2)</u>	+	ox.	-(alk/sauer, ranzig)	-	-	-			-	(+)

Abkürzungen

- ox. = oxydativ
- g = geronnen
- p = peptonisiert
- alk. = alkalisiert
- red. = reduziert

Tabelle 3: Differenzierungsschema für Aeromonaden

	Cytochrom- oxydase	Glukose- spaltung	Arginine- hydrogenase	Gasbildung aus Glukose	Butandiol- dehydrogenase
<u>Ae. hydrophila</u>	+	f	+	+	+
<u>Ae. hydrophila</u> <u>var. anaerogenes</u>	+	f	+	-	+
<u>Ae. punctata</u>	+	f	+	+	-
<u>Ae. punctata</u> <u>var. anaerogenes</u>	-	f	+	-	-

Abkürzung

f = fermentativ

3.2 Ergebnisse

3.21 Vorversuche

3.211 Der Zusatz von Mycostatica zum Glutaminat-Stärke-
Phenolrot-Agar (GSP)

Actidione war ohne hemmenden und fördernden Einfluß auf das Wachstum der Pseudomonaden, während Pimaricin in Konzentrationen von 0,4, 0,8 und 1,6 ml pro 100 ml Nährmedium einen fördernden Einfluß auf Pseudomonaden zu erkennen gab.

Actidione unterdrückte bei Konzentrationen von 100 und 1.000 mcg/ml Nährmedium das Pilzwachstum nur bei 2 von 5 getesteten Schimmelpilzen.

Pimaricin hemmte bei allen angewandten Konzentrationen das Wachstum aller 5 Schimmelpilzarten völlig.

3.212 Die Beeinflussung der Anzüchtungsergebnisse auf GSP-Platten
durch die Expositionsdauer beim Sedimentationsverfahren

Bei einer Expositionsdauer von 45 Minuten konnten während der Stallruhe durchschnittlich 10 vermehrungsfähige Keime pro Nährbodenplatte nachgewiesen werden (Streuung: 5 - 140). Die Koloniezahlen pro Platte während der Fütterungszeit lagen wesentlich höher und erreichten einen Durchschnitt von über 150 je Platte. Eine Expositionsdauer von 60 Minuten führte wegen Keimüberwucherung der Nährböden teilweise zu einer Unauswertbarkeit der Ergebnisse.

3.213 Besprechung der Ergebnisse der Vorversuche

Aus den Versuchen zum Mycostatica-Zusatz zum GSP-Medium ergibt sich, daß eine Konzentration von Pimaricin in der Größenordnung zwischen 80 und 320 mcg/ml Nährmedium als ausreichter Mycostatica-Zusatz zum GSP-Medium geeignet ist.

Der Sicherheit des Verfahrens wegen wird der Zusatz von 200 mcg Pimaricin pro ml Nährboden empfohlen.

Unter den gegebenen Versuchsbedingungen ist bei der Keimbestimmung aus der Luft mittels des Sedimentationsverfahrens eine Expositionsdauer von 45 Minuten zu empfehlen.

3.3 Hauptversuch

3.31 Nachweis von Pseudomonaden und Aeromonaden in Milch - viehställen und Milchkammern

Insgesamt wurden 651 Proben mittels des GSP-Agars und des flüssigen Glutaminat-Mediums bakteriologisch untersucht, wobei 942 Kulturen isoliert werden konnten (Tabelle 4). Bei den 138 Luftsedimentationsproben war nur bei 2 (= 1,5 %) Proben, bei den Tupferproben von der Euteroberfläche dagegen bei 89 % der Proben kein Wachstum auf, bzw. in den Nährböden zu verzeichnen. Von den Stallwänden und aus den Kotproben konnten in der gleichen Größenordnung (knapp 65 %) positive Anzüchtungsergebnisse erzielt werden.

Bei der Bewertung der Anzüchtungsergebnisse je Fundort ergibt sich, daß sich von den Liegeplätzen in 12 Betrieben keine Kulturen isolieren liessen, während für die Luftproben aus allen Ställen auf GSP-Agar Kolonienwachstum zu beobachten war (Tabelle 4).

Berücksichtigt man nur die bei der späteren Differenzierung als Pseudomonaden oder Aeromonaden erkannten Kulturen, dann zeigt sich, daß von 42 Tupferproben von Euteroberflächen in 39 Fällen (92,8 %) keine Pseudomonaden bzw. Aeromonaden zu isolieren waren (Tabelle 5).

Tabelle 4: Die insgesamt auf dem GSP-Agar und im flüssigen Glutamat-Medium isolierten Kulturen.

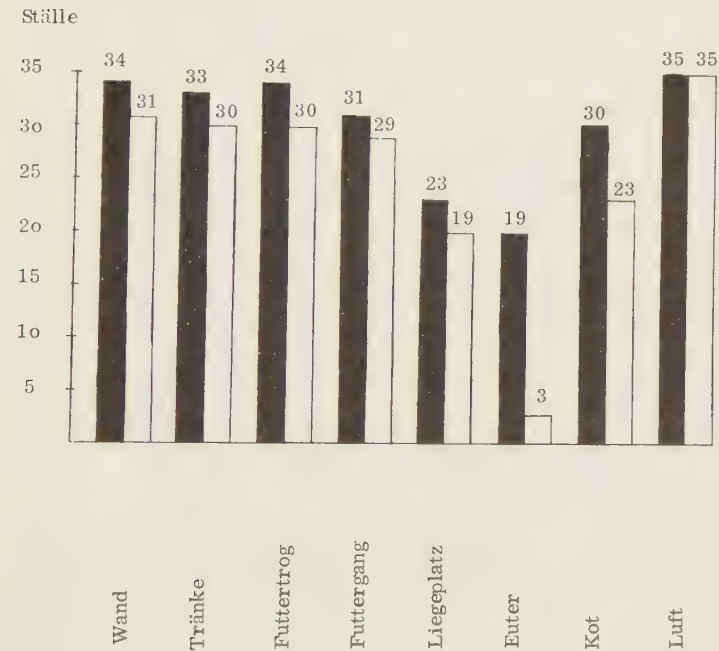
1	2	3	4	5	6
Ort der Probenahme	Proben insgesamt	negative Proben (Anzahl %)	Anzahl Ställe	Ställe mit für diesen Fundort negativen Proben ¹⁾	Anzahl isolierte Kulturen
Wand	137	49	35	1	123
Tränke	69	5	35	2	140
Futtertrog	70	6	35	1	120
Futtergang	68	10	35	4	120
Liegeplatz	70	35	35	12	64
Euter	42	37	35	16	9
Kot	57	22	35	5	64
Luft	138	2	35	0	302
	651	166			942

¹⁾ Keine Isolierung von für Pseudomonaden und Aeromonaden verdächtigen Kulturen.

Tabelle 5: Die auf GSP-Agar und dem flüssigen Glutamat-Medium isolierten Pseudomonaden und Aeromonaden

1	2	3	4	5	6	7
Ort der Probenahme	Anzahl Proben	Proben ohne Nachweis von Ps. und Ae. Anzahl %	Anzahl Ställe	Ställe ohne Nachweis von Ps. und Ae. für diesen Fundort Anzahl %	Pseudomonaden	Aeromonaden
Wand	137	70 51,0	35	4 11,4	43	12
Tränke	69	20 29,0	35	5 14,3	51	32
Futterneg	70	15 21,5	35	5 14,3	56	21
Futtergang	68	13 19,2	35	6 17,1	58	15
Liegeplatz	70	43 61,4	35	16 45,6	32	8
Euter	42	39 92,8	35	32 91,5	3	1
Kot	57	28 49,3	35	12 34,3	27	8
Luft	138	6 4,3	35	0 0,0	115	17
	651	234 35,9			385	114

Abbildung 1: Milchviehställe, in denen auf GSP-Agar vermehrungsfähige Keime, bzw. Pseudomonaden und Aeromonaden nachgewiesen wurden.



Ställe mit für diesen Fundort positiven Proben (Tabelle 4/5)



Ställe mit Nachweis von Pseudomonaden und Aeromonaden für diesen Fundort (Tabelle 5/5)

3.32 Identifizierung und Differenzierung der isolierten Kulturen

3.321 Die Identifizierung nach dem Vermögen zur Glukosespaltung und mittels der Cytochromoxydase-Reaktion

Die über das GSP-Medium bzw. das flüssige Glutaminat-Medium insgesamt isolierten 942 Kulturen wurden zur Vordifferenzierung auf ihr Vermögen, Glukose im HUGH-LEIFSON-Medium zu spalten, sowie in der Cytochromoxydase-Reaktion geprüft.

529 Kulturen spalteten Glukose oxydativ und 251 fermentativ. Eine Glukosespaltung konnte bei 162 Kulturen nicht festgestellt werden. Die Cytochromoxydase-Reaktion fiel bei 517 Kulturen positiv aus. Von diesen Kulturen spalteten 347 Glukose oxydativ, 146 fermentativ und 24 nicht.

Tabelle 6: Das Verhalten von 942 Kulturen im HUGH-LEIFSON-Medium (Glukose) und in der Cytochromoxydase-Reaktion

Glukosespaltung	Cytochromoxydase-Reaktion	Anzahl Kulturen	Beurteilung
+	oxydativ	347	Pseudomonas
+	oxydativ	182	Pseudomonas
+	fermentativ	146	Aeromonas
+	fermentativ	105	Enterobacteriaceae
keine Spaltung	+	24	nicht weiter differenziert
keine Spaltung	-	138	
		942	

3.322

Die Differenzierung der Genera Pseudomonas und Aeromonas

Die weitere Differenzierung der 529 aufgrund ihres Verhaltens im HUGH-LEIFSON-Medium (Glukosespaltung) bzw. bei der Cytochromoxydasereaktion als Pseudomonaden erkannten Kulturen erfolgte anhand der durch sie bedingten Veränderungen von Lackmusmilch und ihrer Fähigkeit zur Kasein- und Gelatinespaltung. Als weitere Differenzierungsmerkmale wurden - wie unter 3.124 dargestellt - die Bildung von Hämolyisin, Katalase und Pyocyanin sowie die Kulturmorphologie auf Nähragar berücksichtigt (Tabelle 2). Die Differenzierung der Aeromonaden erfolgte unter Berücksichtigung der Bildung von Arginindehydrogenase, Meso-2,3-butandioldehydrogenase sowie der Bildung von Gas aus Glukose (Tabelle 3).

Entsprechend den Angaben unter 3.124 (Methodik) konnten 529 Kulturen dem Genus Pseudomonas und 146 dem Genus Aeromonas zugeordnet werden. Als Enterobacteriaceae wurden 105 Kulturen erkannt.

Die in der Cytochromoxydase-Reaktion negativen Pseudomonaden (Glukoseabbau oxydativ) erbrachten bei der Charakterisierung unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich ihres Verhaltens in Lackmusmilch. 42 von insgesamt 68 Kulturen waren zur Kaseinspaltung befähigt.

Tabelle 7: Das Verhalten in Lackmusmilch und das Vermögen zur Kaseinspaltung der Cytochromoxydase-negativen Pseudomonaden
Glukoseabbau: bei allen Kulturen oxydativ

Gruppe	Lackmusmilch	pH	Kasein	Anzahl
I	GPR alk.	(7, 15) 7,7-8,5	+	32
II	GPR sauer	6,9-4,7	+	7
III	GP alk.	7,2-7,9	+	3
IV	GR sauer	6,9-5,2	-	18
V	⊥ R alk.	7,5-8,4	-	5
VI	⊥ R oder sauer/neutral unverändert	6,4-7,15	-	3

Erklärung: G = Gerinnung P = Peptonisation
R = Reduktion

3.33

Das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden im
Milchviehstall

Aus einer Probe wurden häufig identische Kulturen isoliert, so daß folgerichtig bei der weiteren Auswertung der Untersuchungsergebnisse nur eine Kultur berücksichtigt werden konnte.

Von insgesamt 499 zu bewertenden Pseudomonas- bzw. Aeromonas-Kulturen waren 32,8 % (= 163 Stämme) der Fluorescens-Gruppe (einschl. Ps. myxogenes) zuzuordnen. Hinsichtlich der Häufigkeit stand Ps. putida mit 22,8 % an 2. Stelle. Cytochromoxydase-negative Pseudomonaden wurden mit einem Anteil von 13,6 % (68 Kulturen) nachgewiesen. Alle übrigen Spezies lagen jeweils unter 5 % (Tabelle 8).

Ae. hydrophila war mit 37 Kulturen (= 7,4 %) die am häufigsten nachgewiesene Aeromonade, gefolgt von Ae. punctata var. anaerogenes mit 6,6 %.

3.331

Das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden auf
Stallwänden

Von 55 von der Stallwand isolierten Stämmen wurden 17 (= 33 %) als Ps. fluorescens identifiziert (Tabelle 9). In gleicher Häufigkeit (jeweils 20 %) wurden Ps. putida und cytochromoxydase-negative Pseudomonaden erfasst. Von den 12 charakterisierten Aeromonaden gehörten 5 der Species Ae. hydrophila var. anaerogenes an.

3.332

Das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden in
Tränkebecken

Von den 83 aus Tränken isolierten Kulturen erwiesen sich 30 (= 36,4 %) als Aeromonaden. Unter den differenzierten Pseudomonas-Kulturen konnte keine Ps. aeruginosa zugeordnet werden,

Tabelle 8: Häufigkeitsverteilung von Pseudomonas- und Aeromonas-Arten in 651 Proben aus 35 Milch-
viehställen. (Isoliert wurden 499 als Pseudo-
monaden bzw. Aeromonaden identifizierte Stämme.)

	<u>Anzahl</u> <u>Stämme</u>	<u>%</u>	
<u>Ps. fluorescens (1), (2)</u> <u>und Ps. myxogenes</u>	163	32,8	
<u>Ps. putida (1) und (2)</u>	114	22,8	
<u>Ps. species (1)</u>	14	2,8	
<u>Ps. species (2)</u>	22	4,4	
<u>Ps. fragi</u>	1	0,2	
<u>Ps. aeruginosa</u>	3	0,6	<u>Pseudomonaden</u>
<u>Cytochromoxydase -</u> <u>Glukose oxydativ</u>	68	13,6	Anzahl: 385 % : 77,2
<u>Ae. hydrophila</u>	37	7,4	
<u>Ae. hydr. var.</u> <u>anaerogenes</u>	18	3,6	
<u>Ae. punctata</u>	26	5,2	<u>Aeromonaden</u>
<u>Ae. punctata var.</u> <u>anaerogenes</u>	33	6,6	Anzahl: 114 % : 22,8
Zusammen	499	100,0	

Tabelle 9: Häufigkeitsverteilung von Pseudomonas- und Aeromonas-Arten in 137 Abklatschproben von Wänden von 35 Milchviehställen. (Isoliert wurden 55 als Pseudomonaden bzw. Aeromonaden identifizierte Stämme.)

	<u>Anzahl</u> <u>Stämme</u> ,	<u>%</u>	
<u>Ps. fluorescens (1), (2)</u> <u>und Ps. myxogenes</u>	17	31,0	
<u>Ps. putida (1) und (2)</u>	11	20,0	
<u>Ps. species (1)</u>	2	3,6	
<u>Ps. species (2)</u>	2	3,6	
<u>Ps. fragi</u>	0	0,0	
<u>Ps. aeruginosa</u>	0	0,0	<u>Pseudomonaden</u>
<u>Cytochromoxydase -</u> <u>Glukose oxydativ</u>	11	20,0	Anzahl: 43 % : 78,2
<u>Ae. hydrophila</u>	3	5,5	
<u>Ae. hydrophila</u> <u>var. anaerogenes</u>	5	9,1	
<u>Ae. punctata</u>	2	3,6	<u>Aeromonaden</u>
<u>Ae. punctata var.</u> <u>anaerogenes</u>	2	3,6	Anzahl: 12 % : 21,8
Zusammen	55	100,0	

während am häufigsten Ps. fluorescens und Ps. putida nachzuweisen waren. Sehr gering war der Anteil an cytochromoxydase-negativen Pseudomonaden (3,6 %) (Tabelle 10).

3.333

Das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden in Futtertrögen

Von den 77 aus Futtertrögen isolierten Kulturen wurden 56 als Pseudomonaden und 21 (= 27,3 %) als Aeromonaden identifiziert (Tabelle 11).

Am häufigsten kam die Fluorescens-Gruppe (einschließlich Ps. myxogenes) mit 33,8 % vor. In der gleichen Größenordnung lagen die Anteile von Ps. putida mit 14 Stämmen (= 18,2 %) und von cytochromoxydase-negativen Pseudomonaden (15,6 %). Bei den Aeromonaden fällt der hohe Prozentsatz an Ae. punctata (11,7 %) und Ae. hydrophila (9,1 %) auf, während Ae. hydrophila var. anaerogenes selten vorkam (1,3 %).

3.334

Das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden in Futtergängen

Von 73 aus Futtergängen isolierten Kulturen (Tabelle 12) entfielen 11 (= 15,1 %) auf cytochromoxydase-negative Pseudomonaden und die Mehrzahl auf Ps. fluorescens (28,8 %) und Ps. putida (25,2 %). Von Ae. hydrophila und Ae. punctata var. anaerogenes wurden jeweils 5 Kulturen (= 7,0 %) identifiziert.

Tabelle 10: Häufigkeitsverteilung von Pseudomonas- und Aeromonas-Arten in 69 Tupferproben aus Tränken von 35 Milchviehställen. (Isoliert wurden 83 als Pseudomonaden bzw. Aeromonaden identifizierte Stämme.)

	<u>Anzahl</u> <u>Stämme</u>	<u>%</u>	
<u>Ps. fluorescens (1), (2)</u> <u>und Ps. myxogenes</u>	22	26,5	
<u>Ps. putida (1) und (2)</u>	21	25,5	
<u>Ps. species (1)</u>	5	6,0	
<u>Ps. species (2)</u>	1	1,2	
<u>Ps. fragi</u>	1	1,2	
<u>Ps. aeruginosa</u>	0	0,0	<u>Pseudomonaden</u>
<u>Cytochromoxydase -</u> <u>Glukose oxydativ</u>	3	3,6	Anzahl: 53
			% : 63,6
<u>Ae. hydrophila</u>	11	13,3	
<u>Ae. hydr. var.</u> <u>anaerogenes</u>	1	1,2	
<u>Ae. punctata</u>	8	9,6	<u>Aeromonaden</u>
<u>Ae. punct. var.</u> <u>anaerogenes</u>	10	12,1	Anzahl: 30
			% : 36,4
<u>Zusammen</u>	83	100,0	

Tabelle 11: Häufigkeitsverteilung von Pseudomonas- und Aeromonas-Arten in 70 Tupferproben aus Futtertrögen von 35 Milchviehställen. (Isoliert wurden 77 als Pseudomonaden bzw. Aeromonaden identifizierte Stämme.)

	<u>Anzahl</u> <u>Stämme</u>	<u>%</u>	
<u>Ps. fluorescens (1), (2)</u> <u>und Ps. myxogenes</u>	26	33,8	
<u>Ps. putida (1) und (2)</u>	14	18,2	
<u>Ps. species (1)</u>	1	1,3	
<u>Ps. species (2)</u>	3	3,8	
<u>Ps. fragi</u>	0	0,0	
<u>Ps. aeruginosa</u>	0	0,0	
<u>Cytochromoxydase -</u> <u>Glukose oxydativ</u>	12	15,6	
			<u>Pseudomonaden</u>
			Anzahl: 56
			% : 72,7
<u>Ae. hydrophila</u>	7	9,1	
<u>Ae. hydr. var.</u> <u>anaerogenes</u>	1	1,3	
<u>Ae. punctata</u>	9	11,7	
<u>Ae. punct. var.</u> <u>anaerogenes</u>	4	5,2	
			<u>Aeromonaden</u>
			Anzahl: 21
			% : 27,3
Zusammen	77	100,0	

Tabelle 12: Häufigkeitsverteilung von Pseudomonas- und Aeromonas-Arten in 68 Tupferproben aus Futtergängen von 35 Milchviehställen. (Isoliert wurden 73 als Pseudomonaden bzw. Aeromonaden identifizierte Stämme.)

	<u>Anzahl</u> <u>Stämme</u>	<u>%</u>	
<u>Ps. fluorescens (1), (2)</u> <u>und Ps. myxogenes</u>	21	28,8	
<u>Ps. putida (1) und (2)</u>	19	25,5	
<u>Ps. species (1)</u>	1	1,4	
<u>Ps. species (2)</u>	6	8,2	
<u>Ps. fragi</u>	0	0,0	
<u>Ps. aeruginosa</u>	0	0,0	<u>Pseudomonaden</u>
<u>Cytochromoxydase -</u> <u>Glukose oxydativ</u>	11	15,1	Anzahl: 58 % : 79,0
<u>Ae. hydrophila</u>	5	7,0	
<u>Ae. hydr. var.</u> <u>anaerogenes</u>	3	4,2	
<u>Ae. punctata</u>	2	2,8	<u>Aeromonaden</u>
<u>Ae. punct. var.</u> <u>anaerogenes</u>	5	7,0	Anzahl: 15 % : 21,0
Zusammen	73	100,0	

3.335

Das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden auf der Euteroberfläche von Milchkühen

Von Euteroberflächen (Tabelle 13) wurden nur 3 Pseudomonaden-Kulturen isoliert, von denen 2 Ps. fluorescens und eine den cytochromoxydase-negativen Pseudomonaden zuzuordnen waren.

Tabelle 13: Häufigkeitsverteilung von Pseudomonas- und Aeromonas-Arten in 42 Tupferproben von der Euteroberfläche von Rindern aus 35 Milchviehställen. (Isoliert wurden 4 als Pseudomonaden bzw. Aeromonaden identifizierte Stämme.)

	<u>Anzahl</u> <u>Stämme</u>
<u>Ps. fluorescens (1) und (2)</u>	2
<u>Cytochromoxydase - / Glukose oxydativ</u>	1
<u>Ae. hydrophila</u>	1
Zusammen	4

3.336

Das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden auf Liegeplätzen von Rindern.

Aus 70 Tupferproben von den Liegeplätzen (Tabelle 14) der Rinder wurden 32 Pseudomonaden und 8 Aeromonaden isoliert. Davon konnten 12 Stämme der Fluorescens-Gruppe zugeordnet werden und 10 Ps. putida. Cytochromoxydase-negative Pseudomonaden und Ae. punctata var. anaerogenes waren gleich stark vertreten (je 5 Stämme).

Tabelle 14: Häufigkeitsverteilung von Pseudomonas- und Aeromonas-Arten in 70 Tupferproben von Liegeplätzen (der Rinder) in 35 Milchviehställen. (Isoliert wurden 40 als Pseudomonaden bzw. Aeromonaden identifizierte Stämme.)

	<u>Anzahl</u> <u>Stämme</u>	<u>%</u>	
<u>Ps. fluorescens (1), (2)</u> <u>und Ps. myxogenes</u>	12	30,0	
<u>Ps. putida (1) und (2)</u>	10	25,0	
<u>Ps. species (1)</u>	1	2,5	
<u>Ps. species (2)</u>	2	5,0	
<u>Ps. fragi</u>	0	0,0	
<u>Ps. aeruginosa</u>	2 ⁺	5,0	<u>Pseudomonaden</u>
			Anzahl: 32
<u>Cytochromoxydase -</u> <u>Glukose oxydativ</u>	5	12,5	% : 80,0
<u>Ae. hydrophila</u>	3	7,5	
<u>Ae. hydr. var.</u> <u>anaerogenes</u>	0	0,0	
<u>Ae. punctata</u>	0	0,0	<u>Aeromonaden</u>
<u>Ae. punct. var.</u> <u>anaerogenes</u>	5	12,5	Anzahl : 8
			% : 20,0
Zusammen	40	100,0	

⁺ zwei verschiedene Bestände

3. 337

Das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden
im Rinderkot

In den Kotproben (Tabelle 15) wurden 27 Pseudomonaden und 8 Aeromonaden nachgewiesen. Bei den Pseudomonaden entfielen auf die Fluorescens-Gruppe und Ps. putida knapp 50 % der isolierten Stämme. 8 wurden als Aeromonaden erkannt.

3. 338

Das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden in
Luft-Sedimentationsproben aus Milchviehställen und zugehörigen
Milchkammern

Von den aus Luftproben aus Ställen (Tabelle 16) isolierten Stämmen wurden 113 (= 85,7 %) dem Genus Pseudomonas und 19 (= 14,3 %) dem Genus Aeromonas zugeordnet. Auf Ps. fluorescens entfielen 54 Stämme, während den cytochrom-oxydase-negativen Pseudomonaden 15,1 % angehörten. Unter den Aeromonaden war Ae. hydrophila var. anaerogenes mit 6 % am stärksten vertreten.

Auf den GSP-Agar-Platten waren im Durchschnitt 42 Kolonien (Schwankung 0 - 273) gewachsen.

In 8 Milcherzeugerbetrieben wurden ergänzend in den Milchkammern durch das Sedimentationsverfahren Luftuntersuchungen auf Pseudomonaden und Aeromonaden durchgeführt (Tabelle 17). Auf den dort exponierten Platten wuchsen durchschnittlich 9 Kolonien (Streuung 1 - 32), wobei in 6 Betrieben Keimzahlen unter 10 und in 2 Milchkammern Keimzahlen über 20 pro Platte ermittelt wurden.

Tabelle 15: Häufigkeitsverteilung von Pseudomonas- und Aeromonas-Arten in 57 Kotproben aus 35 Milchviehställen. (Isoliert wurden 35 als Pseudomonas- und bzw. Aeromonaden identifizierte Stämme.)

	<u>Anzahl</u> <u>Stämme</u>	<u>%</u>	
<u>Ps. fluorescens (1), (2)</u> <u>und Ps. myxogenes</u>	9	26,1	
<u>Ps. putida (1) und (2)</u>	8	22,7	
<u>Ps. species (1)</u>	2	5,8	
<u>Ps. species (2)</u>	2	5,8	
<u>Ps. fragi</u>	0	0,0	
<u>Ps. aeruginosa</u>	1 ⁺	2,9	<u>Pseudomonaden</u>
<u>Cytochromoxydase -</u> <u>Glukose oxydativ</u>	5	14,0	Anzahl : 27 % : 77,3
<u>Ae. hydrophila</u>	3	8,2	
<u>Ae. hydr. var.</u> <u>anaerogenes</u>	0	0,0	
<u>Ae. punctata</u>	1	2,9	<u>Aeromonaden</u>
<u>Ae. punct. var.</u> <u>anaerogenes</u>	4	11,6	Anzahl: 8 % : 22,7
<u>Zusammen</u>	35	100,0	

⁺ Herkunftsbetrieb nicht identisch mit den Betrieben, auf deren Liegeplätzen Ps. aeruginosa nachgewiesen wurde.

Tabelle 16: Häufigkeitsverteilung von Pseudomonas- und Aeromonas-Arten in 138 Luft-Sedimentations-
proben aus 35 Milchviehställen. (Isoliert wurden
132 als Pseudomonaden bzw. Aeromonaden identi-
fizierte Stämme.)

	<u>Anzahl</u> <u>Stämme</u>	<u>%</u>	
<u>Ps. fluorescens (1), (2)</u> <u>und Ps. myxogenes</u>	54	41,1	
<u>Ps. putida (1) und (2)</u>	31	23,5	
<u>Ps. species (1)</u>	2	1,5	
<u>Ps. species (2)</u>	6	4,5	
<u>Ps. fragi</u>	0	0,0	
<u>Ps. aeruginosa</u>	0	0,0	<u>Pseudomonaden</u>
<u>Cytochromoxydase -</u> <u>Glukose oxydativ</u>	20	15,1	Anzahl: 113 % : 85,7
<u>Ae. hydrophila</u>	4	3,0	
<u>Ae. hydr. var.</u> <u>anaerogenes</u>	8	6,0	
<u>Ae. punctata</u>	4	3,0	<u>Aeromonaden</u>
<u>Ae. punctata var.</u> <u>anaerogenes</u>	3	2,3	Anzahl: 19 % : 14,3
Zusammen	132	100,0	

Tabelle 17: Häufigkeit von Pseudomonas- und Aeromonas-Arten in 16 Luft-Sedimentationsproben aus 8 Milchkammern. (Isoliert wurden 15 als Pseudomonaden bzw. Aeromonaden identifizierte Stämme.)

	<u>Anzahl</u> <u>Stämme</u>
<u>Ps. fluorescens (1), (2)</u> <u>und Ps. myxogenes</u>	11
<u>Ps. putida (1) und (2)</u>	1
<u>Cytochromoxydase - / Glukose oxydativ</u>	2
<u>Ae. hydr. var. anaerogenes</u>	1
	<u>15</u> <u>=====</u>

3.34

Erhebungen über die Beziehung zwischen der "Sauberkeit"
in den Milchviehställen und den Ergebnissen der bakterio-
logischen Untersuchungen der Stallluft und der Stallwände.

Von jedem Milchviehstall wurde der subjektive Eindruck
über den hygienischen Zustand mit den Ziffern

- 1 = sehr schmutzig
- 2 = schmutzig
- 3 = sauber
- 4 = sehr sauber

festgehalten.

Bei dem Versuch der Zuordnung der Keimzahlen der Abklatschproben von der Wand und der Luft-Sedimentationsproben (Keimkoloniebildende Einheit) ergab sich, daß in sehr sauberen Ställen bei den Luftproben nur 10 Keime pro Platte im Mittel anwuchsen, während in den übrigen Ställen die Werte über 36 lagen und in den sauberen Ställen 64 erreichten. Bei den bakteriologischen Untersuchungen der Stallwände lag die durchschnittliche Koloniezahl mit 25 bei den schmutzigen Ställen am niedrigsten, gefolgt von den sehr sauberen Ställen mit 36 und den sauberen bzw. sehr schmutzigen mit 40, bzw. 42 (Tabelle 18).

Tabelle 18:

Gruppe	Anzahl Ställe	Luftproben Ø Anzahl Kolonien pro Platte	Stallwand Abklatsch- proben Ø Anz. Kolonien pro 4 Bügel
1 (sehr schmutzig)	2	52	42
2 (schmutzig)	15	36	25
3 (sauber)	11	64	40
4 (sehr sauber)	6	10	36
	35	Ø 42 (0-273)	Ø 35 (0-183)

3.4

Besprechung der Ergebnisse

Mittels des Glutaminat-Stärke-Phenolrot-Mediums (GSP) nach KIELWEIN gelang in 485 von 651 in Milchviehställen gezogenen Proben = 74,8 % die Anzüchtung von gramnegativen Bakterien. Aufgrund der Identifizierung von 942 isolierten Kulturen ergab sich, daß in 417 Proben (= 64 %) Pseudomonaden und Aeromonaden nachzuweisen waren (Tabellen 4 und 5). Aus diesen Ergebnissen muß gefolgert werden, daß Pseudomonaden und Aeromonaden an der Keimflora des Milchviehstalles in nicht unbeträchtlichem Ausmaße beteiligt sind.

Nach dem Ort der Probeentnahme konnten für die Häufigkeit des Vorkommens von Pseudomonaden und Aeromonaden beträchtliche Unterschiede festgestellt werden. Während nur in 4,3 % der aus Luft stammenden Proben Pseudomonaden und Aeromonaden nicht nachzuweisen waren, gelang die Isolierung aus 61,4 % der von den Liegeplätzen entnommenen Proben nicht. Besondere Beachtung verdient die Feststellung, daß von insgesamt 42 von Euteroberflächen entnommenen Proben nur 3 Pseudomonaden enthielten.

Wenn man nach dem Prozentsatz der für Pseudomonaden und Aeromonaden positiven Proben eine Einteilung versucht, dann lassen sich die Probeentnahmestellen in folgender Reihenfolge einordnen:

LUFT (95,7 %), FUTTERGANG (80,8 %), FUTTERTROG (78,5 %)
TRÄNKEBECKEN (71,0 %), KOT (50,6 %), WAND (49,0 %),
LIEGEPLATZ (38,7 %), EUTEROBERFLÄCHE (7,2 %).

Bei der Fragestellung nach der Anzahl Ställe, für die an einem bestimmten Fundort Pseudomonaden und Aeromonaden nicht nachzuweisen waren, ergibt sich, daß in allen Ställen aus der Luft die Isolierung der genannten Bakterien gelang, während in 32 von 35 Ställen auf den Liegeplätzen Pseudomonaden und Aeromonaden nicht festzustellen waren.

Bei der Bewertung aller Probeentnahmestellen ergeben sich 4 Gruppen für die Häufigkeit des Nachweises von Pseudomonaden und Aeromonaden:

- GRUPPE 1: LUFT: in allen Ställen und Milchkammern nachgewiesen
- GRUPPE 2: TRÄNKEN, FUTTERTRÖGE, FUTTERGANG: Nachweis etwa zwischen 80 und 90 % der Ställe
- GRUPPE 3: KOT und LIEGEPLATZ: Nachweis in etwa 50 - 70 % der Ställe
- GRUPPE 4: EUTEROBERFLÄCHE: Nachweis in knapp 10 % der Ställe

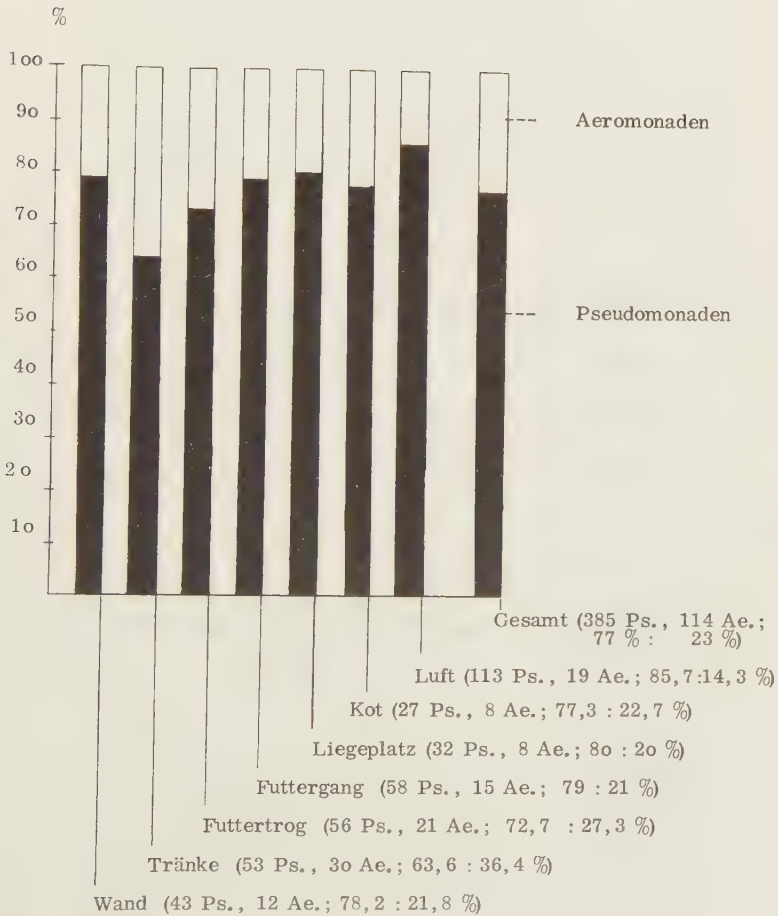
Bei dem zur Anzüchtung der Pseudomonaden und Aeromonaden verwendeten GSP-Medium handelt es sich um ein Selektivmedium. Für die Beurteilung eines solchen Mediums ist neben der Anzüchtungsrate (d. h. des Prozentsatzes der angewachsenen Kolonien) die Selektivität von entscheidender Bedeutung. Die vorliegenden Untersuchungen ermöglichen auch eine Aussage zur Selektivität des GSP-Mediums bei seiner Anwendung im Stallmilieu. Vergleicht man die Anzahl der positiven Anzüchtungsversuche mit der Anzahl der Proben, aus denen Pseudomonaden und Aeromonaden isoliert werden konnten, dann ergibt sich, wie aus den Tabellen 4 und 5 sowie Abbildung 1 ersichtlich, daß für die einzelnen Entnahmestellen Unterschiede entstehen. Die beste Übereinstimmung kann für die Proben aus der Luft, das ungünstigste Verhältnis für die von den Euteroberflächen entstammenden Proben, aber auch für die Kotproben ermittelt werden. Hieraus kann geschlossen werden, daß die Selektivität des GSP-Mediums für Umgebungsuntersuchungen im Stall ausreicht, daß aber dort, wo mit einem häufigen Vorkommen von Enterobakterien zu rechnen ist, (KOT, LIEGEPLÄTZE), eine nicht befriedigende Selektivität in Kauf genommen werden muß.

Von 942 isolierten Kulturen konnten insgesamt 529 dem Genus Pseudomonas und 146 dem Genus Aeromonas zugeordnet werden. Da häufig aus einer Probe mehrere identische Kulturen isoliert wurden, konnte naturgemäß für die Beurteilung nur eine Kultur Berücksichtigung finden. Bewertet wurden daher nur 499 Kulturen, von denen 385 (77,2 %) dem Genus Pseudomonas und 114 (22,8 %) dem Genus Aeromonas angehörten.

Der prozentuale Anteil der Aeromonaden war jedoch für die einzelnen Probeentnahmestellen unterschiedlich (s. Abbildung 2). Für die Tränken lag er mit 36,4 % und für die Futtertröge mit 27,3 % überdurchschnittlich hoch, während der Anteil der Aeromonaden in der Luft mit 14,3 % relativ niedrig lag.

Aus den Ergebnissen der Differenzierungen der dem Genus Pseudomonas angehörenden Kulturen ist zu schließen, daß auch im Stallmilieu mit dem Vorkommen derselben Pseudomonasarten zu rechnen ist, die KIELWEIN³² aus Rohmilch isolierte. Auch für die Pseudomonaden des Stalles ist davon auszugehen, daß Ps. fluorescens und Ps. putida den höchsten Anteil ausmachen. Lediglich Ps. taetrolens konnte nicht isoliert werden, die im Material von KIELWEIN³² mit 3,1 % beteiligt ist. Für Ps. species (1) und Ps. species (2) sowie Ps. fragi wurden für den Milchviehstall ein Anteil an der Pseudomonadenflora in der gleichen Größenordnung wie in Milch ermittelt. Der relativ geringe Anteil von Ps. aeruginosa in der Stallflora verdient Beachtung. Bei den vorliegenden Untersuchungen gelang ihr Nachweis nur im Kot sowie auf den Liegeplätzen; damit werden die Untersuchungsergebnisse von RINGEN und BRAKE⁵⁴ bestätigt.

Abbildung 2: Säulendiagramm zum Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden in den einzelnen Proben.



Anmerkung: Infolge der geringen Anzahl von Stämmen (3 Ps. + 1 Ae.) auf der Euteroberfläche wurden diese hier nicht berücksichtigt.

Tabelle 19: Prozentuale Häufigkeit von Pseudomonas- und Aeromonas-Arten in Proben aus 35 Milchviehställen.

	insgesamt %	Stallwand %	Tränke %	Futtertrog %	Futtergang %	Liegeplatz %	Kot %	Luft %
<u>Ps. fluorescens</u> <u>u. Ps. myxogenes</u>	32,8	31,0	26,5	33,8	28,8	30,0	26,1	41,1
<u>Ps. putida</u>	22,8	20,0	25,5	18,2	25,5	25,0	22,7	23,5
<u>Ps. species (1)</u>	2,8	3,6	6,0	1,3	1,4	2,5	5,8	1,5
<u>Ps. species (2)</u>	4,4	3,6	1,2	3,8	8,2	5,0	5,8	4,5
<u>Ps. fragi</u>	0,2	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<u>Ps. aeruginosa</u>	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	2,9	0,0
<u>Cytochrom. -</u> <u>Glukose oxyd.</u>	13,6	20,0	3,6	15,6	15,1	12,5	14,0	15,1
<u>Ae. hydrophila</u>	7,4	5,5	13,3	9,1	7,0	7,5	8,2	3,0
<u>Ae. hydr. var.</u> <u>anaerogenes</u>	3,6	9,1	1,2	1,3	4,2	0,0	0,0	6,0
<u>Ae. punctata</u>	5,2	3,6	9,6	11,7	2,8	0,0	2,9	3,0
<u>Ae. punct. var.</u> <u>anaerogenes</u>	6,6	3,6	12,1	5,2	7,0	12,5	11,6	2,3
	100	100	100	100	100	100	100	100

Anmerkung: Infolge der geringen Anzahl von Kulturen von der Euter-
oberfläche (3 Pseudomonaden und 1 Aeromonade) wurden
diese hier nicht mit aufgeführt.

Bei einer Bewertung des Nachweises der einzelnen Pseudomonadenarten hinsichtlich ihres Fundortes (Tabelle 19) ergibt sich für Ps. species (1) ein relativ hoher Anteil bei den aus Tränken stammenden Proben und den Kotproben, während Ps. species (2) besonders häufig im Futtergang gefunden wurde. Auffallend ist, daß die cytochromoxydase-negativen Pseudomonaden in den Tränkebecken relativ selten nachzuweisen waren. Für die Häufigkeit des Vorkommens der Aeromonas-Arten ergeben sich einige bemerkenswerte Unterschiede. In den Tränkebecken, auf den Liegeplätzen und im Kot wurde vornehmlich Ae. hydrophila und Ae. punctata var. anaerogenes ermittelt, während die Anteile von Ae. punctata für die Futtertröge relativ hoch lagen.

Einige Pseudomonas-Stämme konnten wegen ihrer biochemischen Eigenschaften bzw. Hemmstoffempfindlichkeit bei der angewendeten Versuchsanordnung nicht miterfaßt werden (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Bei der Differenzierung nicht berücksichtigte Spezies

Spezies	Ursache
Ps. denitrificans Ps. nigrificans Ps. alcaligenes	keine oxydative Glukosespaltung
Ps. boreopolis Ps. maltophilia	können Glutaminsäure nicht als alleinige Kohlenstoffquelle auswerten
Ps. stutzeri	wird durch 100 IE Penicillin-G-Natrium pro ml Nährboden (GSP) gehemmt

Der Versuch, Beziehungen zwischen der Sauberkeit in den Milchviehställen und der Zahl der angewachsenen Kolonien bei Luftsedimentuntersuchungen und bei Abklatschproben von den Stallwänden herzustellen, läßt folgende Schlüsse zu:

In sehr sauberen Ställen ist mit einer geringeren Anzahl von Pseudomonaden und Aeromonaden in der Luft zu rechnen, als in weniger sauberen Ställen. Auffallend ist jedoch, daß die Kolonienzahlen beim Sedimentationsverfahren aus der Luft bei den schmutzigen Ställen niedriger lagen als bei den sauberen Ställen (s. Tabelle 18).

Obwohl beim Abklatschverfahren von den Stallwänden die höchsten Keimzahlen bei den sehr schmutzigen Ställen ermittelt wurden, lassen sich Beziehungen zwischen der Sauberkeit des Stalles und den Keimzahlen an Pseudomonaden und Aeromonaden an den Stallwänden nicht ableiten.

Zusammenfassend können aus den Versuchsergebnissen im Bezug zur Milchhygiene im Milchviehstall die folgenden Schlüsse gezogen werden:

1. Der Milchviehstall stellt ein reiches Reservoir an Pseudomonaden und Aeromonaden dar, wobei die Verteilung der Arten im Stall etwa ihrer Verteilung in Rohmilch entspricht.
2. Als wesentliche Kontaminationsquelle der Milch mit Pseudomonaden und Aeromonaden muß die Luft der Milchviehställe, aber auch die der Milchkammern angesehen werden. Hieraus ergibt sich, daß bei der Gewinnung und Behandlung der Milch im Erzeugerstall, einer Kon-

tamination aus der Luft durch ein rasches Entfernen der Milch aus dem Stall und ein ständiges Abdecken der Milch vorgebeugt werden muß. Allerdings ist zu beachten, daß die entscheidende Kontamination der Milch mit Pseudomonaden aus den milchführenden Teilen der Melkgeräte stammt (KIELWEIN^{30, 32}, BEYTHIEN⁵) und die Luft deshalb nur als zusätzliche Kontaminationsquelle zu beachten ist.

3. Durch Sauberkeit im Milchviehstall ist der Kontaminationsgrad des Stallmilieus mit Pseudomonaden und Aeromonaden, wenn überhaupt, dann nur in geringem Umfange zu beeinflussen.
4. Das Vorkommen von Ps. aeruginosa im Milchviehstall ist auf den Kot und die Liegeplätze der Milchkühe beschränkt.
5. Die Euteroberfläche von Milchkühen stellt nur eine geringgradige Kontaminationsquelle der Milch mit Pseudomonaden und Aeromonaden dar.

Zusammenfassung

In 35 Milchviehställen im Hartkäsereigebiet des württembergischen Allgäus wurden bakteriologische Untersuchungen auf das Vorkommen von Pseudomonaden und Aeromonaden durchgeführt. Untersucht wurden 414 Proben, die an verschiedenen Stellen der Ställe entnommen wurden. Außerdem wurden 138 Luftproben, 57 Kotproben und 42 Abstrichproben von der Euteroberfläche der Milchkühe überprüft.

Als Selektionsmedium fand der GSP-Agar (KIEL WEIN^{29, 32}) und das flüssige Glutaminatmedium Verwendung. Die Isolierung, Identifizierung, Charakterisierung und Differenzierung der Pseudomonaden und Aeromonaden wurden nach dem von KIELWEIN^{32, 33} angegebenen Schema durchgeführt.

Insgesamt wurden 385 Pseudomonaden- und 114 Aeromonadenkulturen isoliert und differenziert.

In allen 35 Ställen und in 8 Milchkammern wurden aus der Luft Pseudomonaden und Aeromonaden isoliert. Nur in 3 Ställen konnten im Abstrichverfahren von der Euteroberfläche von Milchkühen Pseudomonaden und Aeromonaden nachgewiesen werden. Die an anderen Stellen im Stall entnommenen Proben enthielten in relativ hohem Prozentsatz Pseudomonaden und Aeromonaden.

Die Pseudomonadenflora des Stallmilieus erwies sich in etwa der der Rohmilch identisch. Ps. aeruginosa wurde nur im Kot und auf den Liegeplätzen der Kühe nachgewiesen.

Aus den Untersuchungsergebnissen kann gefolgert werden, daß vor allem über die Stallluft und die Luft der Milchkammern eine Kontamination der Milch mit Pseudomonaden und Aeromonaden möglich ist, während der Euteroberfläche als Ausgangspunkt einer Milchkontamination mit diesen Keimen nur geringe Bedeutung zukommt.

1. ASAJ, A. (1959): Die Beziehung der Keimzahl der Luft des Stalles zu anderen mikroklimatischen Elementen (Serb)
Vet. archiv 29, 156 - 164
Zit. bei HURTIENNE, H. (25)
2. BARTA, O. (1958): Ein Beitrag zur Verstaubung in den Ställen für Milchkühe (tschech.).
Veterinárstvi (Praha), 8, 289-291
3. BEER, H. (1963): Zur Diagnostik gramnegativer aerober Stäbchen
Pathologia Microbiol. 26, 607
4. BERGEY'S MANUAL of Determinative Bacteriology by Breed, R. S., E. G. D. Murray and N. R. Smith:
Seventh Edition, Baltimore 1957
5. BEYTHIEN, V. (1969): Untersuchungen über den Einfluß der Wasserversorgung auf die hygienische Beschaffenheit der Milch im Erzeugerbetrieb
Vet.med.Diss. Gießen 1969
6. BUROW, H. u. G. H. HILLIGER (1969): Vergleich des Bakterien- und Staubgehaltes der Stallluft im Absatzverfahren.
Tierärztl. Umschau 24, 155-158
7. CASELITZ, F. H. (1966): Pseudomonas-Aeromonas und ihre human-medizinische Bedeutung
VEB Gustav Fischer Verlag Jena 1966
8. CASELITZ, F. H. u. R. GÜNTHER (1960): Weitere Beiträge zum Genus Aeromonas
Zbl. Bakt. I. Orig. 178, 15
9. COLLINS, E. B. (1955): Factors involved in the control of gelatinous curd defects of cottage cheese. I. Storage temperature and pH
J. Milk Fd Technol 18, 169
10. DE LEY, J. (1964): Pseudomonas and Related Genera
Ann. Rev. Microbiol. 18, 17

11. DEMETER, K. J. (1967): Bakteriologische Untersuchungsmethoden der Milchwirtschaft
Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 1967

12. DEUFEL, J. (1958): Zur Ökologie einiger Pseudomonas-Arten im Bodensee-Obersee
Z. Fischerei Hilfswiss. (NF) 6, 635

13. DRUCE, R. G., N. B. Bebbington, K. Elson, J. M. Harcombe und S. B. Thomas (1957): The determination of the coli-aerogenes content of milk and dairy equipment by plating on Violet Red Bile Agar incubated at 30 °C
J. appl. Bact. 26, 1

- 14a ELLIKER, P. R. (1953): Bacterial defects of cottage cheese
Proc. State Coll. Washington Inst. Dairying 65
zit. nach WITTER (72)

- 14.b EWING, W. H., R. HUGH und J. G. JOHNSON (1961): Studies on the Aeromonas group
U. S. Departement of Health, Education and Welfare, Publ. Hlth. Serv. Communic. Dis. Center, Atlanta, Georgia

15. FRAZIER, H. u. L. RUPP (1928): J. Bact. 16, 57
zit. nach DEMETER (11)

16. GABY, W. L. and C. HADLEY (1957): Practical Laboratory test for the identification of Pseudomonas aeruginosa
J. Bact. 74, 356

17. GORDON, W. A. M. (1963): Environmental studies in pig housing. IV. The bacterial content of air in piggeries and its influence on disease incidence.
Brit. vet. J. 119, 263

18. GRÜN, L. (1968): Zur Epidemiologie der Ps. pyocyanea-Infektionen im Krankenhausbereich
Goldschmidt informiert 1, 2

19. GYLLENBERG, H. G. und Eva EKLUND (1966): A Taxonomic survey of the Psychrophilic Bacteria in Milk an Milk products
Milchwissenschaft 21, 261

20. HABS, H. und K. H. KIRSCHNER (1943): Der Pyoceaneus Meer-schweinchenhautversuch zur Prüfung von Hautdesinfektionsmitteln
Z. Hyg. 124, 557
21. HALLMANN, L. (1953): Bakteriologische Nährböden
Georg Thieme Verlag Stuttgart
22. HILLIGER, G. H. (1968): Zusammenhänge zwischen Staub- und Bakteriengehalt der Stallluft.
Vortrag Österr. Ves. Mikrobiol. und Hyg., Eisenstadt
23. HOADLEY, A. W. and E. Mc COY (1968): Some observations on the ecology of pseudomonas aeruginosa and its occurrence in the intestinal tracts of animals
Cornell Vet. 58, 354
24. HUGH, R. und E. LEIFSON (1953): The taxonomik of fermentative versus oxydative metabolism of carbohydrates by various gram-negativ bacteria
J. Bact. 66, 24
25. HURTIENNE, H. (1967): Vergleich zwischen mehreren Verfahren zur Bestimmung des Keimgehaltes der Stallluft unter verschiedenen Bedingungen.
Vet.med. Diss. Berlin FU
26. HUSSONG, R. V.; LONG, H. F. and B. W. HAMMER (1937): Iowa Agr. Exp. Sta. Res. Bull. 225, 122
zit. nach WITTER (72)
27. JESSEN, O. (1965): Pseudomonas aeruginosa and other green fluorescent pseudomonads
Diss. Copenhagen 1965
28. KIELWEIN, G. (1968): Feststellung und Bewertung von Pseudomonaden in der Milch
Arch. Lebensmittelhyg. 19, 25
29. KIELWEIN, G. (1969): Ein Nährboden zur selektiven Züchtung von Pseudomonaden und Aeromonaden
Arch. Lebensmittelhyg. 20, 131

30. KIELWEIN, G.; R. GERLACH und H. JOHNE (1968): *Pseudomonas aeruginosa*: Untersuchungen über das Vorkommen in Rohmilch und die bakteriologische Charakterisierung
Arch. Lebensmittelhyg. 19, 145
31. KIELWEIN, G.; R. GERLACH und H. JOHNE (1969): Untersuchungen über das Vorkommen von *Aeromonas hydrophila* in Rohmilch
Arch. Lebensmittelhyg. 20, 34
32. KIELWEIN, G. (1970): Untersuchungen über die milchhygienische Bedeutung von Pseudomonaden und Aeromonaden
Habilitationsschrift Gießen
33. KIELWEIN, G. (1971): Die Isolierung und Differenzierung von Pseudomonaden aus Lebensmitteln.
Archiv Lebensmittelhyg. 22, 29-37
34. KLEIN, H. J. und H. P. WERNER (1970): Experimentelle Untersuchungen über die Keimverbreitung durch die Raumluft.
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 214, 123-129
35. KLINGE, K. (1957): Differenzierung der im Wasser vorkommenden Arten des Genus *Pseudomonas* durch die Eigelbreaktion
Arch. Hyg. 141, 348
36. KLINGE, K. (1959): *Ps. fluorescens*, ein Boden- und Wasserkeim. Physiologie und Identifizierung.
Arch. Mikrobiol. 33, 1
37. KNOCH, J. (1971): Untersuchungen zur Bewertung der Leistungsfähigkeit des Standard-Impingers nach Brachmann u. Mit. zum Nachweis von Luftkeimen im Stall.
Vet. med. Diss. Berlin FU
38. KNORR, M.; F. HAAS u. B. KNORR (1956): Beobachtungen über das Versagen der biologischen Sperre bei der Entkeimung des versinkenden Wassers
Arch. Hyg. 140, 130

39. KORTH, H. (1963): Über einen chinasaurehaltigen Nährboden zur Differenzierung und Anreicherung von *Ps. aeruginosa*
Zbl. Bakt. I. Orig. 190, 225
40. KOVACS, N. (1956): Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction
Nature Lond. 178, 705
41. KUNDRAT, W. (1966): Psychrophile Bakterien in Milch und Milchprodukten
Arch. Lebensmittelhyg. 17, 160
42. LINDE, K. und J. GRUHN (1960): Verwendung ionogener Oberflächennetzer in der bakteriologischen Nährbodentechnik
Zbl. Bakt. I. Orig. 178, 356
43. LODE, A. (1929): *Bacillus pyocyaneus*.
Hdb. path. Mikroorgan. VI; 1, 149
44. LOWBURY, E. J. (1951): Improved culture methods for the detection of *Ps. aeruginosa*
J. clin. Path. 4, 66
45. LYSENKO, O. (1961): *Pseudomonas* - an attempt at a general classification
J. gen. Microbiol. 25, 379
46. MÖLLER, Vagn (1955): Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system
Acta path. microbiol. scand. 36, 158
47. NAKANISHI, T.; T. NAKAE and B. S. RASAN (1967): Psychrophilic bacteria of raw milk
zit. n. Biol. Abstr. 50, 4
48. NAYLOR H. B. and P. A. SMITH (1946): Factores affecting the viability of *serratia marcescens* during dehydration and storage
I. Bact. 52, 565
zit. nach Wagenaar (69)
49. NIKODEMUSZ, J. (1959): Ein einfacher Nährboden für die Isolierung der *Pseudomonas*-Stämme aus Lebensmittelprodukten
Arch. Lebensmittelhyg. 10, 7

50. ORR, Margaret J., R. M. Mc LARTY and S. BAINES (1965):
Further investigations on alternate-day collection of bulk milk
Dairy Inds 30, 278
zit. nach Dairy Sci. Abstr. 27, 2192
- 51.a PULVERER, G. u. H. KORTH (1962): Zur Biochemie und Fermentstruktur von *Pseudomonas aeruginosa*
Zbl. Bakt. I. Orig. 186, 36
- 51.b PARK, R. W. A. (1962): A study of certain heterotrophic polary flagellate water bacteria: *Aeromonas*, *Pseudomonas* and *Comamonas*
J. gen. Microbiol. 27, 121
52. REHER, H. D. (1965): Untersuchungen über das Vorkommen und die Bedeutung psychrotoleranter Bakterien für die Haltbarkeit der Vorzugsmilch
Vet. med. Diss. Hannover 1965
Ref. Milchwissenschaft 20, 546
53. REITER, B.; T. F. FRYER and E. M. SHARPE (1965): A method of maintaining a reference flora of constant biological composition
J. Dairy Res. 32, 89
54. RINGEN, L. M. and C. H. DRAKE (1952): A study on the incidence of *Pseudomonas aeruginosa* from various natural sources.
J. Bact. 64, 841
55. ROEDER, G. (1929): Milchwirtschaftliche Forsch. 7, 365 (1929)
zit. nach Schönherr: Tierärztliche Milchuntersuchung S. Hirzel Verlag Leipzig 1965
56. SCHÖNHERR, W. (1959): Untersuchungen über den Keim- und Staubgehalt der Luft in Massivbau-ställen und beim Weidemelken.
Milchwissenschaft 14, 50 - 56
57. SCHUBERT, R. H. W. (1960): Untersuchungen über die Merkmale der Gattung *Aeromonas*
Zbl. Bakt. I. Orig. 180, 310

58. SCHUBERT, R. H. W. (1963): Über die biochemischen Eigenschaften von *Aeromonas hydrophila*
Zbl. Bakt. I. Orig. 188, 62
59. SCHUBERT, R. H. W. (1964): Zur Taxonomie der anaerogenen Aeromonaden
Zbl. Bakt. I. Orig. 193, 343
60. SCHUBERT, R. H. W. (1964): Zur Taxonomie der Voges-Proskauer-negativen "hydrophila-ähnlichen" Aeromonaden
Zbl. Bakt. I. Orig. 193, 482
61. SCHUBERT, R. H. W. (1967): Die Systematik der Aeromonaden
Arch. Hyg. Bakt. 150, 681
62. SHEWAN, J. M., G. HOBBS and W. HODGKISS (1960): A determinative scheme for the identification of certain genera of gramnegative bacteria. With special reference to the Pseudomonadaceae
J. appl. Bact. 23, 379
63. SIMONART, P. and R. LAMBERT (1953): Suggestions for the microbiological control of milk
Int. Dairy Congress 2, 317
64. STANIER, R. Y.; H. J. PALLERONI u. M. DOUDOROFF (1966): The aerobic pseudomonads: a taxonomic study
J. gen. Microbiol. 43, 159
65. STEEL, K. J. (1963): J. gen. Microbiol. 25, 297
zit. nach J. DE LEY (10)
66. THOMAS, S. B. (1949): The types of bacteria commonly found in farm and creamery water supplies and their action on milk and milk products
J. Soc. Dairy Technol. 2, 224
67. THOMAS, S. B. (1966): Sources, incidence and significance of psychrophilic bacteria in milk.
Milchwissenschaft 21, 270

68. TILL, J. (1969): Untersuchungen zum Vorkommen und zur Charakterisierung milchhygienisch bedeutungsvoller Pseudomonaden
Vet.med. Diss. Gießen
69. WAGENAAR, R.O. (1952): The Bacteriology of Sureface-Taint Butter: A Review
J. Dairy Sci. 35, 403
70. WAGNER, K. (1964): Die Oxydase-Reaktion als Mittel zur Erkennung von Pseudomonas-Arten und zu ihrer Isolierung aus Gemischen mit anderen gramnegativen Bakterien.
Vet.med. Diss. Gießen
71. WINKLE, S. (1955): Mikrobiologische und serologische Diagnostik 2. Aufl.
Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1955
72. WITTER, Lloyd D. (1961): Psychrophilic Bacteria - a Review
J. Dairy Sci. 44, 983

LEBENS LAUF

geb. am 25. 6. 1946	in Ravensburg als Sohn des Albert Albrecht, Großhandelskaufmann und seiner Ehefrau Gertrudis Anna Albrecht, geb. Kade
1953 - 1957	Volksschule Aulendorf
1957 - 1963	Progymnasium Aulendorf
1963 - 1966	Wieland-Gymnasium Biberach
Februar 1966	Abitur bestanden
Sommersemester 1966 - Wintersemester 1967/68	Studium an der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Gießen
März 1968	Tierärztliche Vorprüfung bestanden
Sommersemester 1968	Studium an der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität München
Wintersemester 1968/69 - Wintersemester 1970/71	Studium an der Tierärztlichen Hochschule Hannover
Sommer 1971	Tierärztliche Prüfung in Hannover abgelegt
27. September 1971	Bestallung als Tierarzt

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Kielwein für die Überlassung der Arbeit und vor allem für die großzügig gewährte Freiheit bei der Ausführung der Versuche sowie die verständnisvolle Führung, die nie dirigistisch war, sondern stets überzeugte.

Dem Vorstand des Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamtes Aulendorf, Herrn Ob. Reg. Vet. Direktor Prof. Dr. K. Dedié, danke ich für seine fachlichen Anregungen und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut.

Gedankt sei auch allen Mitarbeitern der Milchabteilung des Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamtes Aulendorf, die mir bei der Lösung technischer Einzelprobleme bereitwillig Hilfe leisteten.

